UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG NEURONALER UND GLIALER ZELLEN IN KULTUREN AUS DEM VERTEBRATEN-NERVENSYSTEM

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

VORGELEGT VON

BÄRBEL RANSCHT
AUS MERSEBURG

1983

UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG NEURONALER UND GLIALER ZELLEN IN KULTUREN AUS DEM VERTEBRATEN-NERVENSYSTEM

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

VORGELEGT VON

BÄRBEL RANSCHT
AUS MERSEBURG

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 25.8.1983
Dekan: Prof. Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Seifert
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Ammermann

MEINEN ELTERN

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1979 bis November 1981 bei Dr.habil.W.Seifert am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Institute in Tübingen und während eines dreimonatigen Forschungsaufenthalts bei Prof.M.C.Raff am University College in London angefertigt.

Danken möchte ich

Herrn Dr.habil.W.Seifert für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und das Ermöglichen vieler nützlicher wissenschaftlicher Kontakte;

Herrn Prof.M.C.Raff für den erfolgreichen Aufenthalt in seinem Laboratorium und viele grundlegende Diskussionen;

Herrn Dr.habil.M.Wabl und Frau G.Beck-Engesser für die Einführung in die Hybridoma-Technologie und viele nützliche Ratschläge;

Herrn Dr.P.Clapshaw, Herrn Dr.M.Noble und Herrn J. Price für wertvolle Unterstützung und hilfreiche Diskussionen;

Herrn Dr.P.Burrows und Herrn Dipl.Biochem.H.J.Fink für viele anregende Diskussionen und nützliche Vorschläge;

Herrn Dr.J.Morgan für Anregungen bei der Modifikation des ELISA-Testsystems;

Drs. E.Abney, A.Bignami, P.Burrows, J.Cohen, N.A. Gregson, K.Fields, S.Liebowitz, R.Mirsky, M.C.Raff und A.F.Williams für die freundliche Überlassung von Antiseren;

allen Mitarbeitern des Elektronenmikroskopie-Laboratoriums des Max-Planck-Instituts für Virusforschung (Leiter Dr.H.Frank) für das Präparieren und Photographieren der subzellulären Fraktionen;

den Mitarbeitern des Labors, Frau Pharm.appr.S.Beckh, Herrn N.Buckley, Frau L.Dentzer und Frau A.Fichtner für vielseitige Hilfe;

den Mitarbeitern des Photolabors der Max-Planck-Institute (Leiter Dr.H.Frank) für das Entwickeln und Vervielfältigen der Photographien;

allen Mitarbeitern des Friedrich-Miescher-Laboratoriums für die freundliche Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

A4	spezifisches Antigen zentraler Neuronen
ACh-E	Acetylcholinesterase
BBS	Borat-gepufferte Saline
BSA	Rinder-Serumalbumin
CNPase	2'3'-cyklische Nukleotid-3'-Phosphohydrolase
cNADP	cyklisches Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz, Dihydrat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
FITC	Floureseinisothiocynat
FKS	fötales Kälberserum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GalC	Galaktocerebrosid
GFAP	Glial-Fibrillary-Acidic-Protein
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEE	Hühnerembryoextrakt
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-Äthansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
KRB	Krebsringer-Bicarbonat
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
NGF	Nerve Growth Factor
MEM	Minimal Eagle's Medium
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBSF	Phosphat-gepufferte Saline mit 1%BSA und 0,01% Natriumazid
PEG	Polyäthylenglykoll
PNS	peripheres Nervensystem
PSI	Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

PVC	Polyvinylchlorid
RAN 1	Schwann-Zell-spezifisches Antigen in Ratten
RT	Raumtemperatur
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Min.)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SPM	synaptische Plasmamembranen
Sulf	Sulfatid
Thy1.1.	spezifisches Antigen auf Fibroblasten und Lymphozyten
TRIS	TRIS(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
U (Unit)	Enzymeinheit : 1 µM hydrolisiertes Substrat bzw. gebildetes Produkt pro Min. bei 37°C
UDP	Uridindiphosphat
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Antikörper

Fl-	Antikörper mit FITC-Markierung
Rd-	Antikörper mit TRITC-Markierung
-GAM	Ziegen-Immunglobulin gegen Maus-Antikörper
-GAR	Ziegen-Immunglobulin gegen Kaninchen-Antikörper
-Ig	Immunglobulin (alle Klassen)
-IgG	Immunglobulin G
-IgM	Immunglobulin M
r	Antiserum aus dem Kaninchen
m	monoklonale Maus-Antikörper

INHALTSVERZEICHNIS

I EINFÜHRUNG IN DIE PROBLEMATIK Seite 1

II MATERIAL 15

III METHODEN 26

1. Zellbiologische Methoden 26
2. Immunologische Methoden 40
3. Biochemische Methoden 50
4. Elektronenmikroskopie 57
5. Photographie 58

IV ERGEBNISSE 59

Teil I

Untersuchungen zur Entwicklung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen 59

1. Herstellung monoklonaler Antikörper 59
2. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper 68
3. Untersuchungen zur Entwicklung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen unter Anwendung der mGalC-Antikörper 93

Teil II

Untersuchungen zur Entwicklung zentraler Neuronen 112

1. Vorversuche zur Schaffung optimaler Grundvoraussetzungen für die Kultivierung von Hippocampus-Zellen 112
2. Entwicklung der Hippocampus-Zellen in vitro 116

V DISKUSSION Seite 135

Teil I
Untersuchungen zur Entwicklung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen 135

Teil II
Untersuchungen zur Entwicklung zentraler Neuronen 144

VI ZUSAMMENFASSUNG 150

Teil I
Untersuchungen zur Entwicklung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen 150

Teil II
Untersuchungen zur Entwicklung zentraler Neuronen 151

VII LITERATURVERZEICHNIS 152

I. EINFÜHRUNG IN DIE PROBLEMATIK

1. Spezifität im Nervensystem

Das Vertebraten-Nervensystem steuert und koordiniert nahezu alle Funktionen des tierischen Organismus. Diese komplexe Aufgabe obliegt - im Beispiel des menschlichen Nervensystems - mehr als 10 Milliarden spezifisch untereinander verschalteten, impulsleitenden Nervenzellen, die von der etwa zehnfachen Anzahl glialer Zellen umgeben werden. Die selektiven Wechselwirkungen zwischen dieser Vielzahl von neuralen Zellen erfordern ein hohes Maß an zellulärer Spezifität.

Die Ursachen der Spezifität im Nervensystem formulierte Roger Sperry in seiner Chemoaffinitätshypothese (R.Sperry, 1963) , die er später folgendermaßen zusammenfaßte (R.Sperry, 1965) : ' It now appears that the complicated nerve fiber circuits of the brain grow, assemble and organize themselves through the use of intricate chemical codes under genetic control. Early in development, the nerve cells, numbering in billions, aquire and retain thereafter, individual identification tags, chemical in nature by which they can be recognized and distinguished from one another '. Sperry's Hypothese der molekularen Spezifität einzelner Zellpopulationen gilt im weitesten Sinne für alle Zellen des zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystems (PNS) : Neben interneuronalen Wechselwirkungen sind auch spezifische Neuron-Glia und intergliale Wechselwirkungen bekannt.

Trotz experimenteller Stützen für Sperry's Hypothese (S.H. Barondes, 1970; A.J.Barbera et al., 1973; A.J.Barbera, 1975) sind Arbeiten über die molekularen Spezifitäten neuraler Zellpopulationen rar. Die Problematik der Analyse ist vielseitig : Die Isolierung homogener Zellpopulationen aus dem Nervengewebe ist schwierig, häufig liegen die interessierenden Komponenten quantitativ unterhalb der Nachweisgrenze biochemischer Analysentechnik.

Die Einführung immunologischer Techniken in die Neurobiologie eröffnete Einblicke in die molekularen Besonderheiten neuraler Zellgruppen : Zunächst ermöglichten konventionelle Antiseren gegen dominante Moleküle des Nervensystems - wie Neurofilament (B.Anderton et al., 1980), Glial-Fibrillary-Acidic-Protein (GFAP) (A.Bignami et al.,1972) oder Galaktocerbrosid (GalC)(M.Raff et al.,1978)- deren eindeutigte Zuordnung zu bestimmten neuronalen oder glialen Zellpopulationen. Neurofilamente und GFAP gehören zu den intrazellulär lokalisierten 10nm-Filamenten (D.Bray and D.Gilbert, 1980) und sind somit an den Wechselwirkungen zwischen Zelloberflächen-Molekülen zumindest nicht direkt beteiligt. Die Antikörper gegen diese Filamente können zwar nicht für Untersuchungen der Zellwechselwirkungen eingesetzt werden, sind aber für die Identifikation der beiden neuralen Zelltypen die bisher einzigen zuverlässigen Hilfsmittel.
Die Technologie der Antikörper-Produktion durch Klonierung fusionierter Lymphozyten (G.Köhler and C.Milstein, 1975) eröffnete der molekularen Analyse neuraler Zellpopulationen neue Dimensionen : Als herausragender Vorteil dieser Methode zeigt sich der Erhalt spezifischer Antikörper für individuelle Antigen-Determinanten in molekular heterogenen Zellpopulationen oder Fraktionen. Die Etablierung monoklonaler Antikörper gegen Nervengewebe demonstrierte zum ersten Mal die molekulare Diversität der Zelloberflächen verschiedener neuronaler Subpopulationen (J.Cohen and Y.Selvendran, 1981; T.Vulliamy et al., 1981). Obwohl die Identifikation der Determinanten noch aussteht, sprechen diese Ergebnisse für Sperry's Konzept der molekularen Spezifität im Nervensystem.

Wie wird die Spezifität im sich entwickelnden Nervensystem determiniert ? Welches sind die auslösenden Faktoren ? Wann während der Embryonalentwicklung wird die zelluläre Spezifität ausgeprägt ? Welche Rolle spielen dabei Wechselwirkungen mit anderen Zellen des Nervensystems ? Welches sind die zellspezifischen Determinanten und welche Rolle spielen sie bei den zellspezifischen Funktionen ?
Diese grundlegenden Fragen der Neurobiologie können mit den neu eingeführten immunologischen Methoden - speziell mit Hilfe monoklonaler Antikörper - erfolgversprechend bearbeitet werden.

Für die vorliegende Arbeit sind zwei Aspekte dieses Fragenkomplexes von besonderem Interesse :
a). Die Ausprägung zellspezifischer Moleküle im sich entwickelnden Nervensystem wird am Beispiel der Myelin-bildenden Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems - den Oligodendrozyten und Schwann-Zellen - analysiert. Dabei wird unter Anwendung eines spezifischen, in dieser Arbeit etablierten monoklonalen Antikörpers zum erstenmal die entwicklungsabhängige Aufeinanderfolge der Expression der chemisch nur geringfügig verschiedenen Lipide Galaktocerebrosid und Sulfatid auf den Oberflächen individueller Zellen beschrieben. Diese Unterscheidung führt zu der Identifikation der ersten, während der Differenzierung dieser Zellen exprimierten, zellspezifischen Komponente (Teil I).
b). Der Einfluß glialer Zellen auf die neuronale Differenzierung wird am Beispiel embryonaler Hippocampus-Neuronen untersucht. In einem erstmals beschriebenen, serumfreien Kultursystem wird eine von Gliazellen produzierte Aktivität entdeckt, die sich für das Auswachsen neuronaler Fortsätze als essentiell erweist (Teil II).

2. Zelluläre Diversität im Nervensystem

Die Kenntnis der zellulären Diversität des Vertebraten-Nervensystems geht auf frühe histologische Untersuchungen um die Jahrhundertwende zurück (C.Golgi, 1886; S.Ramon Y Cajal, 1909-1911; W.His, 1887 und 1890). Schon in diesen frühen Arbeiten werden die Zellen des Nervensystems in zwei Hauptkategorien geteilt : neuronale und nicht-neuronale Zellen.

Neuronen bilden als Überträger elektrischer Signale die funktionellen Einheiten des Nervensystems. Die Informationsübertragung erfolgt an spezialisierten Kontaktpunkten, den Synapsen (C.S.Sherrington, 1906), zwischen neuronalen Zellen oder neuronalen Zellen und Zellen des Zielorgans (Muskeln, Drüsen). Über ihre Funktion, ihre Position im Gehirn, der elektrophysiologisch charakterisierbaren Erregungsleitung und das für die Informationsübertragung benutzte Trans-

mittersystem (G.M.Shepherd,1979) werden neuronale Unterklassen definiert. Die einzelnen Neuronenpopulationen zeichnen sich in der Regel durch eine charakteristische Morphologie aus.

Als nicht-neuronale Zellen finden sich im Nervensystem verschiedene Gliaklassen : Oligodendrozyten,Astrozyten, Ependymzellen und Mikroglia im zentralen und Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem.

Oligodendrozyten bilden eine lipidhaltige Isolierschicht - das Myelin - um schnell leitende Nervenfasern des ZNS (R.P. Bunge, 1968).
Die Funktion der Astrozyten ist weniger klar umrissen : Neben der ihnen zunächst zugewiesenen Rolle als Stützsubstanz für Neuronen (R.Virchow, 1860) weisen neuere Arbeiten auf eine Beteiligung der Astrozyten bei der Regulation der extrazellulären Ionenkonzentration (H.M.Gerschenfeld et al., 1959; S.W.Kuffler and J.G.Nicholls, 1966), der Transmittermetabolisierung (F.A.Henn and A.Hamberger, 1971) und der Reparatur nach Gehirnverletzungen hin. Während der Entwicklung des Nervensystems bilden Zellen des Astrozytentyps ein Substrat für die Migration der jungen Neuronen aus der Keimzone hin zu ihrer jeweils determinierten Position im Cortex oder Cerebellum (M.Jacobson,1979).
Die mit Cilien besetzten Ependymzellen kleiden den Zentralkanal und die Gehirnventrikel aus, die Cilien zeigen in die mit Cerebrospinalflüssigkeit gefüllten Hohlräume.
Die als Gehirnmakrophagen agierenden Mikrogliazellen phagozytieren Debris nach dem natürlichen Absterben von Gehirnzellen oder nach Gehirnverletzungen. Dieser Zelltyp unterscheidet sich ontogenetisch von den übrigen Zellen des Nervensystems : Mikrogliazellen entstehen aus dem Mesoderm, während die übrigen neuralen Zellen aus dem Ektoderm hervorgehen.
Die gemeinsame Funktion der Schwann-Zellen des PNS mit den Oligodendrozyten des ZNS ist die Bildung des Myelins. Zentrales und peripheres Myelin unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer molekularen Komposition.

Für die Identifikation der verschiedenen Klassen neuraler Zellen werden mehrere Kriterien angewandt : Die Klassifikation von Zellen in situ erfolgt traditionell aufgrund ihrer Position im Nervensystem sowie aufgrund morphologischer Kriterien in Licht- und Elektronenmikroskopie. Für Neuronen werden zudem elektrophysiologische und pharmakologische Kriterien angewandt : Die verschiedenen Neuronen unterscheiden sich durch die Frequenz und Amplitude ihrer Aktionspotentiale und die für die Erregungsübertragung benutzten Neurotransmitter. Für neurale Zellen in vitro sind morphologische Kriterien oft nicht ausreichend; vor allem in Kulturen des sich entwickelnden Nervensystems existieren eine Reihe nicht ausgereifter Morphologien.Für die Identifikation von neuralen Zellen wurden vor einigen Jahren erstmals immunologische Methoden eingesetzt (A.Bignami et al., 1972; J.Brockes et al.,1977; M.Raff et al., 1978 und 1979); die Sichtbarmachung zellspezifischer Markermoleküle durch direkte oder indirekte Immunfluoreszenz oder immunenzymatische Reaktionen ist seitdem ein unentbehrlicher Bestandteil der zellulären Neurobiologie. Die genannte Methodik verbunden mit morphologischen Anhaltspunkten erlaubt die einfache Analyse der Zusammensetzung neuraler Zellpopulationen : Protoplasmatische und fibrilläre Astrozyten sowie die Bergmann-Gliafasern des Cerebellums werden aufgrund eines intermediären Filamentproteins, dem Glial-Fibrillary-Acidic-Protein (GFAP) identifiziert (A.Bignami et al., 1972; S.H.Yen and K.Fields, 1981). Die Myelin-bildenden Zellen des ZNS und PNS, die Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, exponieren an ihren Zelloberflächen ein spezifisches Glykolipid, das Galaktocerebrosid (M.Raff et al., 1978; R. Mirsky et al., 1980). Ein weiteres Merkmal von Schwann-Zellen ist die Expression des Antigens RAN 1 (J.Brockes et al., 1977).

Neurofilament-Proteine konstituieren die spezifischen 'Intermediären Filamente' der Neuronen des ZNS und PNS (B.Anderton et al., 1980). Zudem sind die Rezeptoren für Tetanustoxin, die Ganglioside GD_{1b} und GT_1 sowie das Gangliosid GQ als spezifische Markermoleküle für Neuronen postuliert worden (R. Mirsky et al., 1978; G.Eisenbarth et al., 1979). Neuere Ar-

beiten weisen darauf hin, daß die zellspezifische Expression dieser Lipide in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Versuchstiere variiert: In frühen Entwicklungsstadien (z.B. beim optischen Nerv von 7 Tage alten Ratten) finden sich die genannten Ganglioside zusammen mit dem für ZNS-Neuronen spezifischen Antigen A4 (J.Cohen and Y.Selvendran, 1981) auch an fibrillären Astrozyten (M.Raff,1981).
Ependym-Zellen in vitro können bisher nur aufgrund morphologischer Kriterien identifiziert werden : Dieser Zelltyp ist mit sich aktiv bewegenden Cilien besetzt.
Mikroglia-Zellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, den F_c-Teil von Antikörpern an spezifische F_c-Rezeptoren binden zu können.
Die bisher nicht erwähnten Leptomeninges-Zellen zeigen mit Fibroblasten vergleichbare morphologische und immunologische Eigenschaften : Beide Zelltypen sind in vitro abgeflacht und reagieren positiv mit Antikörpern gegen Fibronectin (M.Raff et al., 1979).

3. Entwicklung des Nervensystems

Die Anlage des zentralen und peripheren Nervensystems entsteht während der späten Gastrulationsphase des sich entwickelnden Vertebratenembryos (M.Jacobson,1979; W.M.Cowan, 1978 und 1979). Ein dorsales Ektodermsegment des Blastozyten wird zur Ausbildung der Neuralplatte induziert (Induktionsphase). Durch Einstülpen dieses Rudiments bildet sich das Neuralrohr, aus dem die Elemente des zentralen Nervensystems entstehen. Die Einheiten des peripheren Nervensystems haben ihren Ursprung in der Neuralleiste, einer spezialisierten, aus der Neuralplatte entstandenen ektodermalen Zellgruppe, die sich dorsal über dem noch nicht geschlossenen Neuralrohr formiert.Nach dem Schließen des Neuralrohrs setzt eine Phase massiver Zellvermehrung ein (Proliferationsphase). Die Dauer der Mitosezyklen und die Anzahl der Teilungen ist für jede Neuronen-Population genau determiniert, schon in dieser frühen Entwicklungsphase ist die Neuronenklasse und ihre künftige Position im Nerven-

system festgelegt. Während der Proliferationsphase entstehen neben den jungen Neuronen auch Glioblasten. Diese Zellen proliferieren auch noch in späten Entwicklungsphasen, wenn die Neuronen bereits ihre Teilungsfähigkeit eingestellt haben. Aus den Glioblasten entstehen die verschiedenen Gliazellen des ZNS. Die Endposition der jungen Neuronen im Nervensystem wird durch Wanderung von ihrem Entstehungs- zu ihrem Bestimmungsort erreicht (Migrationsphase). Dort finden sich Neuronen gleicher Art zu Aggregaten zusammen und bilden die Anlage für die verschiedenen Gehirnteile (Aggregationsphase). Die Ausprägung der zellspezifischen Eigenschaften erfolgt während der Differenzierungsphase. In diesem Entwicklungsabschnitt entstehen die verschiedenen neuronalen Phänotypen und ein Repertoir zellspezifischer Moleküle. Die der Differenzierung zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher wenig untersucht. Sich differenzierende Nervenzellen bilden Axone und Dendriten aus, für jede Neuronenpopulation existiert ein charakteristisches Neuritenverzweigungsmuster. Die Neuronen werden durch adäquate Reize erregbar und beginnen mit der Synthese spezifischer Neurotransmitter. Deren Ausschüttung an den distalen Axonenden ermöglicht die Erregungsübertragung auf benachbarte Neuronen oder Zellen des Effektororgans an den sich später entwickelnden synaptischen Kontaktpunkten (Phase der Synapsenbildung). Während der Entwicklung des Nervensystems wird ein Überschuß an neuronalen Zellen und synaptischen Verbindungen gebildet. Durch Elimination von neuronalen Zellen (Phase des selektiven Zelltods) wird die Größe der Neuronenpopulation in Abhängigkeit von der Größe des zu innervierenden Zielgebiets reguliert. Eine zweite Regulation erfolgt während der sich anschließenden Phase der Elimination von neuronalen Fortsätzen und synaptischen Kontakten.

4. Differenzierung Myelin-bildender Zellen

Die Myelin-bildenden Zellen des ZNS und PNS, die Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, haben ihren Ursprung in verschieden-

en Embryonalanlagen : Oligodendrozyten entstehen aus Zellen des Neuralrohrs, Schwann-Zellen aus Zellen der Neuralleiste. Trotz dieser Trennung während der frühen Embryonalentwicklung haben beide Zelltypen in ihren verschiedenen Umgebungen die gleiche Funktion : Die Ausbildung und Erhaltung des Myelins, einer lipidhaltigen Isolierschicht um schnell leitende Axone.

Die Erkenntnisse über die Entwicklung und die molekularen Besonderheiten der Myelin-bildenden Zellen sind in den letzten Jahren rasch vorangeschritten :
Die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten entstehen zusammen mit den jungen Neuronen während der Proliferationsphase neuroektodermaler Zellen (F.C.Sauer, 1935; W.M.Cowan, 1979). Die jungen Glioblasten erreichen ihre Position im ZNS durch Migration und entwickeln dort ihren differenzierten Phänotypus. Morphologisch differenzierte , mit immunologischen Methoden erkennbare Oligodendrozyten sind erst wenige Tage vor Beginn der Myelinisierung aufzuspüren, während Zellen des Astrozytentyps schon in früheren Phasen der Embryonalentwicklung erkennbar sind. Die Vorläuferzellen der Astrozyten und Oligodendrozyten sind - zumindest in ihren frühen Entwicklungsstadien - morphologisch und immunologisch nicht unterscheidbar (E.R.Abney et al., 1981). Diese und andere Beobachtungen (H.Fugita and S.Fugita, 1964) führten zu der Annahme einer gemeinsamen Stammzelle für Astozyten und Oligodendrozyten. Ob dieses Konzept richtig ist, muß die zukünfige Forschung zeigen.

Die Abhängigkeit der Differenzierung der Oligodendrozyten von zellulären Wechselwirkungen wurde von Fulcrand und Privat (J.Fulcrand and A.Privat, 1977) untersucht : Die Autoren geben experimentelle Stützen für die Hypothese, daß während einer kritischen Entwicklungsphase der Kontakt mit Axonen für die Ausbildung und Differenzierung der Oligodendrozytenpopulation eine wichtige Voraussetzung ist. Nach der Konfrontation mit dem kritischen axonalen Signal prägen die Oligodendrozyten ihre zellspezifischen Charakteristika

aus und behalten diese - auch nach dem Entfernen des axonalen Kontakts - bei. Das axonale Signal wird während früher Phasen der Embryonalentwicklung gegeben : In neuronenfreien Kulturen aus Rattenembryonen oder neugeborenen Tieren entwickeln sich Oligodendrozyten mit den Myelin-spezifischen Molekülen (R.Mirsky et al.,1980). Die Expression dieser Komponenten in kultivierten Zellen paralellisiert den Verlauf der Entwicklung der Oligodendrozyten in vivo (E.R.Abney et al., 1981).
Im Gegensatz zu den Beobachtungen im ZNS stehen Befunde aus dem peripheren Nervensystem : Für Schwann Zellen ist ein kontinuierlich wirkendes axonales Signal für die Expression der Myelin-spezifischen Moleküle erforderlich. So verlieren Schwann Zellen aus dem Ischias-Nerv in Kulturen, die keine Neuronen enthalten (J.Brockes et al., 1979), die Myelin-spezifischen Komponenten (R.Mirsky et al., 1980).

Die mit anderen Elementen des peripheren Nervensystems aus der Neuralleiste hervorgegangenen Schwann-Zellen unterscheiden sich auch in anderen Aspekten von den Oligodendrozyten des ZNS.
Die am besten unter Kulturbedingungen zu vergleichende Morphologie der Myelin-bildenden Zellen zeigt die Schwann Zellen als bipolare Zellen. Oligodendrozyten hingegen bilden eine variable Anzahl langer, radial angeordneter, mitunter knötchenartig verdickter Fortsätze aus, die bei älteren Zellen zu großen Membranlappen verschmelzen. Die unterschiedliche, in Kultur beobachtete Morphologie der Myelin-bildenden Zellen ist in vivo durch die verschiedene Morphologie des zentralen und peripheren Myelins repräsentiert : Schwann-Zellen myelinisieren nur jeweils ein Axon (H.de F.Webster, 1975), während eine Oligodendrogliazelle jeweils mehrere verschiedene Axone mit Myelin umfaßt (R.P.Bunge, 1968; N.H.Sternberger et al.,1978).

Im Zusammenhang mit der Frage nach den molekularen Mechanismen der Myelinbildung ist die Kenntnis der molekularen Komposition des Myelins und der Myelin-bildenden Zellen von grundlegender Bedeutung.

Durch biochemische Analysen sind spezifische Proteine und Lipide des Myelins identifiziert worden.
Zu diesen Proteinen gehören das basische Protein des Myelins (E.H.Eylar, 1972; W.M.Kies et al.,1972), Proteolipid-Protein, (J.Folch and P.Stoffyn, 1972) und Wolfgram-Protein (F.Wolfgram, 1966). Untereinheiten des Wolfgram-Proteins sind identisch mit dem Myelin-spezifischen Enzym 2',3' cyklische Nukleotid-3'Phosphodiesterase (CNPase) (R.J.Drummond and G. Dean, 1980; T.J.Sprinkle et al., 1980). Zentrales und peripheres Myelin unterscheiden sich in ihrer Proteinkomposition. P_o, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30 Kilodalton, ist das dominante Protein des peripheren Myelins (S. Greenfield et al.,1973). Von den basischen Proteinen P_1 und P_2 (Molekulargewichte 12 bzw. 18 Kilodalton) hat nur P_1 ein Gegenstück im zentralen Nervensystem (S.W.Brostoff et al., 1975). Proteolipid-Protein wird im peripheren Myelin nur in geringen Mengen vorgefunden.
Zentrales und peripheres Myelin zeigen einen hohen Gehalt an den Myelin-spezifischen Galaktosphingolipiden Galaktocerebrosid und dessen Sulfatester Sulfatid (W.T.Norton and L.A.Autilio, 1966; W.T.Norton, 1977). Im Einklang damit stehen die hohen Aktivitäten der diese Glykolipide synthetisierenden Enzyme UDP-Galaktose-Ceramid-Galaktosyltransferase und Cerebrosid-Sulfotransferase. In einigen Tierspezies ist das Gangliosid GM_4 eine weitere Myelin-spezifische Komponente (R.W.Ledeen et al., 1980).

Die Kenntnis der molekularen Spezifität des Myelins und die Zuordnung der Myelin-spezifischen Moleküle zu morphologischen Änderungen während der Entwicklung der Oligodendrozyten und Schwann-Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Myelinisierung. Wann während der Embryonalentwicklung beginnt die Differenzierung der Myelin-bildenden Zellen ? Welche der Myelin-spezifischen Komponenten wird während der Entwicklung dieser Zellen als erste exprimiert ? Welche Rolle kommt diesem Molekül bei der Ausbildung des Myelins zu ? Diese Fragen können mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen einzelne Myelinkomponenten beantwortet werden.

Die Frage nach der Ausprägung der ersten Myelin-spezifischen Komponente während der Entwicklung der Oligodendrozyten und Schwann-Zellen wird in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Grundlage für diese Analyse ist die Etablierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Sphingolipid Galaktocerebrosid. Diese Antikörper ermöglichen Doppelmarkierungen mit Kaninchen-Antiseren in indirekter Immunfluoreszenz. Mit den monoklonalen Antikörpern gegen Galaktocerebrosid und Kaninchen-Antiseren gegen Sulfatid wird durch Doppelmarkierungen an vereinzelten Oligodendrozyten und Schwann-Zellen die Expression der Galaktolipide während der Entwicklung der Myelin-bildenden Zellen verfolgt. Die Untersuchungen werden mit frisch isolierten Zellsuspensionen und in Zellkulturen aus dem sich entwickelnden Nervensystem der Ratte durchgeführt.

5. Differenzierung neuronaler Zellen

Im sich entwickelnden Nervensystem, vor der Ausbildung selektiver Synapsen, bilden die jungen postmigratorischen Neuronen Axone und Dendriten aus. Die Wachstumskegel ('growth cones') der sich verlängenden Axone explorieren ihre kontaktile Umgebung (D.Bray, 1970) und finden selektiv die richtigen Effektorzellen, an denen sie stabile Synapsen ausbilden. Die oft weitreichenden und komplizierten dendritischen Verzweigungen verschiedener Neuronenpopulationen dienen der Vergrößerung des rezeptiven Felds dieser Zellen. Welchen molekularen Mechanismen diese Entwicklung unterliegt, ist eine bisher ungelöste Frage der Neuobiologie.
In der vorliegenden Arbeit wird ein Teilaspekt der Entwicklung neuronaler Zellen untersucht. Dabei wird die Frage gestellt, welche äußeren Faktoren bei postmitotischen Neuronen das Auswachsen von Neuriten beeinflussen.
Für die Beantwortung dieser Frage sind neuronale Zellen in Kultur am besten geeignet : Vorgänge, die in die Differenzierung eingreifen, können einzeln und im Zusammenspiel beobachtet und analysiert werden.

Zellen aus dem sich entwickelnden Nervensystem werden - zumeist als heterogen zusammengesetzte Zellpopulationen - seit mehreren Jahren mit zunehmenden Erfolg kultiviert (G.Banker and W.M.Cowan, 1977; J.Booher and M.Sensenbrenner, 1972; J. Cohen and Y.Selvendran, 1981). Für die Kultivierung werden geeignete Kulturmedien mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren - meist in heterogener, chemisch nicht-identifizierbarer Komposition in Form von Serum - verwendet.
Für die Entwicklung bestimmer neuronaler Zellpopulationen in vitro sind jedoch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren oft nicht ausreichend oder in ihrer Wirkung zu unspezifisch.
Die Differenzierung der sympathischen und sensorischen Neuronen des PNS und deren Überleben in Kultur ist von einem trophischen Faktor, dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) (R.Levi-Montalcini, 1966) abhängig. Diese Aktivität ist sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Wirkungsweise charakterisiert (Übersicht bei L.A.Greene and E.Shooter, 1980) und als kleines aktives Protein mit einem Molekulargewicht von 26 Kilodalton (ß-Untereinheit) identifiziert worden.
Da NGF nur ganz spezifisch auf sympathische und sensorische Neuronen wirkt, ist anzunehmen, daß andere Neuronenpopulationen entsprechend der unterschiedlichen, in vivo auf diese Zellen wirkenden Einflüsse andere Faktoren für ihre Entwicklung benötigen.
So wurde in Kulturen aus verschiedenen Teilen des Nervensystems die Abhängigkeit der Ausbildung neuronaler Fortsätze von trophischen Faktoren beobachtet: Von Muskelzellen konditionierte Kulturmedien wirken auf die Differenzierung von Rückenmarksneuronen (C.H.Henderson et al., 1981). Im PNS beeinflußt ein von Astrozyten synthetisierter Faktor die Differenzierung der Neuronen aus Hinterwurzelganglien, nachdem ihre entwicklungsabhängige Sensitivität für NGF abgeklungen ist (R.Lindsay, 1979). Andere Autoren beschreiben trophische Faktoren, die die Differenzierung und das Überleben peripherer Neuronen in vitro unterstützen (S.Varon et al.,1979; M.R.Bennet and V.Nurcombe, 1979; T. Ebendal et al., 1979; Y.Barde et al., 1979). Die molekulare Identität dieser Faktoren ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

Die meisten Zellkulturen aus dem sich entwickelnden Nervensystem sind als Testsysteme für trophische Aktivitäten schlecht geeignet, da die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen neuralen Zellen die eindeutige Analyse der beobachteten Effekte erschweren. Zusätzlich ist die Kultivierung der Zellen in chemisch nicht-definierten, serumhaltigen Kulturmedien wegen der Vielfalt der im Serum enthaltenen Komponenten für die chemische Identifikation der aktiven Faktoren von weiterem Nachteil.
Durch die Einführung der serumfreien, chemisch-definierten Kulturmedien (J.Bottenstein and G.Sato, 1979) wurden die Bedingungen für die Untersuchung trophischer Faktoren wesentlich vereinfacht : Durch diese Bedingung entfallen Wechselwirkungen mit Serumkomponenten, die unbekannten Parameter des Systems werden eliminiert. Optimale Bedingungen werden durch die Kultivierung einer homogenen Zellpopulation erreicht.
In der vorliegenden Arbeit wird als Grundlage für die Analyse trophischer Faktoren aus dem ZNS ein serumfreies, neuronales Kultursystem aus einem Teil des zentralen Nervensytems, dem Hippocampus, etabliert.

Der Hippocampus wurde wegen seines einfachen anatomischen Aufbaus und des charakterisierten Verlaufs einer Entwicklung ausgewählt (G.Banker and W.M.Cowan, 1977; R.L.Isaacson and K.H.Primbam, 1975).
Diese Struktur zeichnet sich durch den regelmäßigen Aufbau aus nur drei Neuronenklassen aus : Den granulären Neuronen der Fascia Dentata, den Pyramiden-Neuronen des Hippocampus proper und den überall im Hippocampus verteilten Korb-Neuronen. Die Pyramiden-Neuronen CA_1 bis CA_3 sind excitatorisch und arbeiten vermutlich mit dem Neurotransmitter Glutamat. Die inhibitorischen Neuronen des Hippocampus, die Korb-Neuronen, benutzen als kleine Interneuronen den Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA).
Durch ^{3}H-Thymidin-Markierungen ist der Zeitpunkt der Entstehung der verschiedenen Neuronenpopulationen des Hippocampus bekannt (G.Banker and W.M.Cowan, 1979) : Die Pyramiden-Neuronen der Ratte durchlaufen ihre Proliferationsphase

zwischen dem 15. und 18. Tag der Embyonalentwicklung mit einem Gipfel proliferativer Aktivität zwischen dem 15. und 17. Tag . Die granulären Neuronen entstehen einige Tage später.
In Kulturen aus den Hippocampi 18 - 19 Tage alter Rattenembryonenen wurde beobachtet, daß sich hauptsächlich die 48 Stunden vor der Dissoziation des Zellverbandes postmitotisch gewordenen Pyramiden-Neuronen entwickeln (G.Banker and W.M.Cowan, 1977).

Die von G.Banker und W.M.Cowan gemachten Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Etablierung eines serumfreien Kultursystems aus dem Hippocampus einbezogen. Durch die Entwicklung eines serumfreien, chemisch-definierten Kultursystems sollen Bedingungen geschaffen werden, die für die Untersuchungen trophischer Faktoren geeignet sind. Mit diesem System soll untersucht werden, ob Gliazellen trophische Faktoren produzieren, die das Auswachsen neuronaler Fortsätze stimulieren.

II. MATERIAL

1. Tiere

Ratten

Stamm Wistar von Dr. Ivanovas, Kisslegg/ Allgäu oder - für die am University College, London, durchgeführten Versuche - von der Imperial Cancer Research Fund Tierkolonie, Mill Hill, England.
Es wurden 15 Tage trächtige Tiere geliefert, für die Experimente wurden Rattenembryonen im Alter zwischen 15 - 21 Tagen und neugeborene Tiere bis Tag 5 post partum verwendet.

Mäuse

Stamm Balb/c, Alter - 6 Wochen von Gl. Bomholtgaart Ltd., Ty, Dänemark.

Rinder

Hirne geschlachteter Tiere wurden vom Schlachthof Tübingen bezogen.

2. Zell-Linien

X63-Ag8.653

Dieser Klon der Balb/c-Maus-Myelomazellinie P3-X63-Ag8 wurde von J. Kearney et al. etabliert (Kearney J. et al., 1979). Die X63-Ag8.653 Myelomalinie zeichnet sich durch den Verlust der Immunglobulinexpression der bei der Stammlinie noch synthetisierten Kettenkomposition γ_1 und κ aus.

C6

Diese Astrocytomalinie wurde aus einem mit Methylnitrosoharnstoff induzierten Rattenhirntumor kloniert (Benda et al.,

1968). Die Zellen wurden über die Firma Flow-Laboratories GmbH, Bonn, bezogen.

B12

Diese von D. Schubert und seinen Mitarbeitern (Schubert, D. et al., 1974) etablierte Zellinie stammt wie die C6-Zellen aus einem mit Methylnitrosoharnstoff induzierten Rattenhirntumor . Die Linie wurde von D. Schubert zur Verfügung gestellt.

3T3

Die Fibroblastenlinie aus Swiss-Albino Mäusen wurde von Todaro und Green (Todaro, G. and H. Green, 1963) etabliert und über die Firma Flow-Laboratories GmbH, Bonn, bezogen.

3. Kulturmedien

MEM	Minimum Essential Medium (Eagle) (Eagle, H., 1955)
MEM/HEPES	Minimum Essential Medium (Eagle) gepuffert mit 20 mM Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium (Vogt, M. and R. Dulbecco, 1963)
RPMI 1640	(Moore, G., 1967)

Alle Medien wurden in der Medienküche des Max-Planck-Instituts für Virusforschung hergestellt. Für die in London (University College) durchgeführten Versuche wurden Medien der Imperial Cancer Research Fund Medienküche benutzt. Alle Medien enthielten Zusätze der Antiobiotika Penicillin und Streptomycin.

4. Zusatzlösungen für Zell- und Gewebekulturen

4.1. Allgemein

FKS	Foetales Kälberserum, Boehringer, Mannheim

PSI — Pferdeserum;Seromed, München. Das Komplementsystem wurde durch Inkubation des Serums bei 56 °C (30 min) inaktiviert.

HEE — Hühnerembryoextrakt; Gibco, Karlsruhe

Glutamin — 200 mM Stocklösung; Seromed, München

Trypsin — Sigma, St. Louis.
Gebrauchslösung: 0,125 % Trypsin in MEM/HEPES

Trypsin/EDTA — Gebrauchslösung: 0,05 % Trypsin und 0,02 % Ethylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz in PBS

Kollagenase — Typ I, Sigma, St. Louis
0,05 % Gebrauchslösung in MEM/HEPES

PBS — Phosphat-gepufferte Saline, pH 7,4
50 g NaCl
1,25 g KCl
7,19 g Na_2HPO_4
1,25 g KH_2PO_4 auf 5000 ml H_2O dest.

KCl — Merck, Darmstadt

$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ — Stocklösung 3,8 % in H_2O dest.

BSA — Rinder-Serumalbumin
Sigma, St. Louis

Trypsin-Inhibitor — aus Sojabohnen, Sigma, St. Louis

Ara C — Cytosin-Arabinofuranosid; Sigma, St. Louis
Stocklösung: 1 mM

Poly-L-Lysin — Typ VIIB und Typ II; Sigma, St. Louis

Kollagen — Typ III; Sigma, St. Louis

PEG — Polyethylen-Glykoll,4000; Roth, Karlsruhe
50 % in PBS

4.2. Lösungen zur Kultivierung von embryonalem Ratten-Hippocampus

1. Insulin — Sigma, St. Louis
Stocklösung 750 µg/ml in DMEM

2. Hydrocortison

Sigma, St. Louis
Stocklösung 1 µg/ml (3 x 10^{-6}M) in DMEM

3. Transferrin

Sigma, St. Louis
Stocklösung 150 µg/ml in DMEM

4. Triiodothyronin

Sigma, St. Louis
Stocklösung 30 µg/ml (4,5 x 10^{-8}M) in DMEM

4.3. Lösungen zur Selektion von Myeloma-Milzzell-Hybriden (HAT-Stocklösungen) (J.W. Littlefield, 1964)

Hypoxanthin — 6-Hydroxypurin, Serva, Heidelberg
Stocklösung: 10^{-2}M in H_2O dest.

Thymidin — Sigma, St. Louis
Stocklösung: 1,6 x 10^{-3}M in H_2O dest.

Aminopterin — 4-Aminopteroylglutaminsäure, Sigma, St. Louis
Stocklösung: 4 x 10^{-5}M in H_2O dest.

Die 100-fach konzentrierten Stocklösungen wurden steril filtriert und in 10 ml Aliquots bei -20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

5. Plastik- und Glasmaterial für die Zell- und Gewebekultur

Gewebekultur-Schalen

Falcon 3003, 100 x 20 mm	Becton/Dickinson, Heidelberg
Falcon 3002, 60 x 15 mm	" " "
Falcon 3001, 35 x 7 mm	" " "

Gewebekultur-Flaschen

Costar 50 ml	Tecnomara, Zürich
Costar 275 ml	" "
Nunc 500 ml	Nunc, Kopenhagen

Mikrotiter-Platten

Costar^{24}	Tecnomara, Zürich
Costar^{96}	" "
Linbro^{24}	Flow Laboratories

Röhrchen

Sterilin-Röhrchen (25 ml)	Sterilin Ltd., Teddington, Middlesex, England
50 ml konische Röhrchen	Becton/Dickinson, Heidelberg (Falcon)
Einfrierröhrchen	Greiner, Nürtingen

Filter

Nalgene 100 ml und 500 ml 0,45 µm Porendurchmesser	Nalge, Vertrieb durch Science, Services, München

Deckgläschen

10 mm Durchmesser (rund)	Menzel-Gläser
13 mm Durchmesser (rund)	Menzel-Gläser

sterilisiert durch Abflammen nach Eintauchen in 100 % Äthanol.

6. Sonstiges Plastikmaterial

Spritzen

verschiedene Größen, 1 - 20 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
Kanülen 18G, 20G, 21G, 23G. 25G und 26G	" " "

Mikrotiter-Platten für ELISA

Flexible 96-Loch-Mikrotiter-Platten aus Polyvinylchlorid (PVC), M25, Cooke Laboratory Products	Dynatech, Nürtingen

Eppendorf-Röhrchen	Greiner, Nürtingen

7. Materialien für die Chromatographie

Silicagel(60)-Platten	
20 x 20 cm und 20 x 10 cm	Macherey-Nagel, Düren
Dowex 50 WX 8	
(100 - 200 mesh)	Serva, Heidelberg

8. Chemikalien und Reagentien

8.1 Sprühreagenzien zum Entwickeln der Lipid-Chromatogramme

1. H_2SO_4	
50 % H_2SO_4 in H_2O dest.	Merck, Darmstadt
2. Primulin	EGA-Chemie, Steinheim
Stocklösung 100 mg/ 100 ml H_2O dest.	

8.2 Sonstige Chemikalien und Reagentien

Fluorescein-Diacetat	
5 mg/ml in Aceton	Serva, Heidelberg
2,6,10,14-Tetra-Methyl-Pentadecan (Pristan)	Aldrich Europe
Folin-Chiocalteau Phenol-Reagenz	Sigma, St. Louis
Unisolve-100	Zinsser, Frankfurt

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Lösungsmittel sind analysenreine Produkte der Firma Merck, Darmstadt.

9. Naturstoffe

BSA

Rinder-Serumalbumin		Sigma, St. Louis

Ovalbumin

		Sigma, St. Louis

Lipide

Sphingosin	B 88	Serdary Research Laboratories, London, Ontario (Kanada)
Ceramid	B 90	" " "
Psychosin aus Rinderhirn	A 464	" " "
Galaktocerobrosid (N-Lignoceryl-DL-Dihydrogalakto-cerebrosid)	B 92	" " "
Glucocerebrosid (N-Palmitoyl-Dihy-droglucocerebrosid)	B 91	" " "
Sulfatid aus Rinderhirn		Serva, Heidelberg
Ganglioside aus Rinderhirn	A 47	Serdary Research Laboratories
Cerebroside aus Rinderhirn	A 46	" " "

P-Nitrophenyl-Phosphat

Substrat 104	Sigma, St. Louis

Alkalische Phosphatase

Typ VII	Sigma, St. Louis

Freund's komplettes Adjuvans

64-285-1	Miles Laboratories, INC

Freund's inkomplettes Adjuvans

64-286-1	Miles Laboratories, INC

2'3'cyclisches Nicotinamid Dinukleotid-Phosphat (NADP)	Sigma, St. Louis
Glucose-6-Phosphat	Sigma, St. Louis
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Typ XII	Sigma, St. Louis
Eserinsulfat	Sigma, St. Louis

10. Radioaktive Substanzen

^{14}C-Acetylcholin-Hydrochlorid	Amersham-Buchler, Braunschweig

11. Antikörper

Die während der Arbeit verwendeten Antikörper sind tabellarisch zusammengestellt. Tabelle 1 zeigt die zur Zellidentifizierung verwendeten Antikörper, ihre Herkunft und die Lokalisation des dazugehörigen Antigens in oder auf der Zelle. In Tabelle 2 sind die konjugierten Antikörper zusammengefaßt.

12. Geräte

Brutschrank FS Modell 3314	Forma Scientific, Mariette, Ohio, USA
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar
Kamera Leicaflex	Leitz, Wetzlar
Mikroskop mit Fluoreszenz-Optik	Leitz, Wetzlar
Kamera Orthomat	Leitz, Wetzlar
Spektralphotometer	Zeiss

Elektronenmikroskop Elmiskop 102	Siemens
Minifuge	Heraeus-Christ, Osterode
Ultrazentrifugen	Beckmann, Paolo Alto, Californien, USA
	Sorvall, Newton, Conn., USA
Fraktionssammler mit UV-Monitor	LKB, München

Tabelle 1: Zellspezifische Antikörper

Antiserum	Produziert in	Herkunft	Zell-Spezifität	Lokalisation	Antigen	Bemerkung
A 4	Maus	Dr.J.Cohen	Neuronen im ZNS	Zellmembran	unbekannt	monoklonal (IgM)
Anti-GFAP	Kaninchen	Dr.A.Bignami	Astrozyten	intra-zellulär	GFAP	
Anti-GalC	Kaninchen	Dr.M.Raff	Oligodendrozyten	Zellmembran	GalC	
Anti-GalC	Kaninchen	Dr.S.Liebo-witz	Oligodendrozyten	Zellmembran	GalC	
Anti-Sul-fatid	Kaninchen	Dr.S.Liebo-witz	Oligodendrozyten	Zellmembran	Sulfatid	
Anti-Thy1.1	Kaninchen	Dr.A. Wil-liams	Fibroblasten	Zellmembran	Thy1.1	
RAN 1	Maus	Dr.K.Fields	Schwann-Zellen	Zellmembran	unbekannt	
Anti-Teta-nustoxin	Maus	Dr.K.Fields	-	-	Tetanus-Toxin	
38/D7	Maus	Dr.R.Mirsky	Neuronen im PNS	Zellmembran	unbekannt	monoklonal (IgM)

Tabelle 2: Konjugierte Antikörper

Antiserum	Konjugat	Bemerkung	Verdünnung	von
Ziege Anti-Maus IgG	Rhodamin	adsorbiert an neugeborenem Rattenhirn	1:50	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande
Ziege Anti-Kaninchen IgG	Rhodamin	adsorbiert an neugeborenem Rattenhirn	1:50	" "
Ziege Anti-Kaninchen Ig	Fluorescein	adsorbiert an neugeborenem Rattenhirn	1:50	" "
Ziege Anti-Maus IgG-γ_3	Rhodamin		1:50	" "
Ziege Anti-Maus IgM	Fluorescein		1:40	" "
Kaninchen Anti-Maus IgG-γ_1	alkalische Phosphatase		1:500	Dr.P.Burrows
" " " IgG-γ_{2a}	"		1:500	"
" " " IgG-γ_{2b}	"		1:500	
" " " IgG-γ_3	"		1:200	selbst gekoppelt
" " " IgM	"		1:500	Dr.P.Burrows
" " " IgA	"		1:500	"
" " " λ	"		1:500	"
" " " κ	"		1:500	"
Kaninchen-Anti-Maus IgG	Peroxidase		1:50	Dr.Rhona Mirsky

III. METHODEN

1. Zellbiologische Methoden (Zellkultur)

Alle genannten Zellen wurden bei 37 °C in feuchter, CO_2-haltiger (5 %) Atmosphäre kultiviert.
Wegen der unterschiedlichen Kulturbedingungen sind die einzelnen Zellsysteme gesondert aufgeführt.

1.1 Zellinien

A. Myeloma-Zellinie X63Ag8.563

a. Kultivierung

Die Zellinie wurde in 275 ml-Zellkultur-Flaschen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und 50 nM Mercaptoäthanol gezüchtet. Dieses Medium wird im Text "vollständiges RPMI-Medium" genannt.

b. Subkultivierung

Wegen der kurzen Zellzyklusdauer von ca. 8 Stunden in der logarithmischen Wachstumsphase war eine häufige Subkultivierung dieser Zellinie erforderlich. Als schonende und gründliche Methode, die Zellen von ihrer Unterlage abzulösen, erwies sich das Abkratzen mittels eines sterilen Gummischabers. Die Subkultivierung erfolgte bei etwa 70 % Konfluenz. Das Medium über den Zellen wurde abgesogen, die Zellen abgekratzt und in einem kleinen Volumen frischen Kulturmediums wieder aufgenommen. In der Regel konnten die Zellen einer Flasche auf 4 neue Flaschen verteilt werden.

c. Lagerung

Die Zellinien wurden bei -180 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

d. Einfrieren der Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen in Kulturmedium mit doppelter Serumkonzentration und 10 % Dimethylsulfuxid (DMSO) eingefroren und langsam an die niederige Lagertemparatur von -180 °C adaptiert. Die Zellen wurden - wie für die Subkultivierung beschrieben - von ihrer Unterlage gelöst und durch Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 Min. (Heraeus-Christ, Minifuge) pelletiert. Das überstehende Kulturmedium wurde verworfen, die Zellen einer Flasche in 1 ml vorgekühlten (4 °C) Einfriermediums suspendiert und in Einfrierröhrchen gegeben. Durch Aufbewahren der Zellen zunächst bei -20 °C, dann bei -80 °C erfolgte die Adaptation an niederige Temperaturen vor der Überführung in den flüssigen Stickstoff.

e. Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte rasch (37 °C, Wasserbad), um Zellschädigungen durch Umkristallisationen im Temperaturbereich zwischen -20 °C und 0 °C oder durch das vorhandene Dimethylsulfoxid möglichst gering zu halten. Sofort nach dem Flüssigwerden wurde der Ampulleninhalt mit Kulturmedium verdünnt, die Zellen abzentrifugiert (1000 rpm, 5 Min., Heraeus-Christ, Minifuge), der DMSO-enthaltende Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium suspendiert. Die Zellen einer Ampulle wurden in eine Zellkultur-Flasche gegeben und wie unter a. beschrieben kultiviert.

B. Astrozytoma-Linien C6 und B12 und 3T3-Fibroblasten

Die genannten Zellinien wurden in DMEM versehen mit 10 % FKS auf Falcon-Gewebekultur-Schalen kultiviert und ansonsten wie Myelomazellen gehandhabt. Der einzige veränderte Parameter war die Methode zum Ablösen der Zellen von der Kulturunterlage: Die Zellen wurden durch Einwirken einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA in PBS für 2 - 5 Min. bei 37 °C) in Suspension gebracht.

Für experimentelle Zwecke wurde das normale Kulturmedium über den Zellen durch serumfreies, hormonhaltiges DMEM substituiert. Folgende Hormone wurden verwendet:

Hormon	Endkonzentration
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	1 µg/ml
Hydrocortison	6,7 ng/ml
Triiodothyronin	200 pg/ml

1.2 Primärkulturen aus verschiedenen Teilen des Nervensystems

A. Beschichtung der Kulturunterlage

In der Regel heften sich primäre Zellen des Nervensystems nicht oder schlecht an Gewebekulturplastik . Durch Beschichtung der Unterlage mit natürlichen Substraten wurden deshalb geeignete Bedingungen für das Anheften der Zellen geschaffen.

a. Kollagen-Beschichtung (Bornstein, M., 1958, und Simkovitch, 1959, - modifiziert)

30 mg Kollagen (Typ III) aus Kälberhaut wurden in 50 ml 1:1000 verdünnter Essigsäure unter Rühren gelöst. Die zu beschichtende Fläche wurde mit der Kollagenlösung bedeckt und das Kollagen durch einstündiges Bedampfen mit Ammoniak polymerisiert. Nach Absaugen der überstehenden Lösung wurden die Platten getrocknet und unter UV-Licht sterilisiert. Vor dem Auftragen der Zellen wurden die Platten dreimal mit DMEM gewaschen und über Nacht in vollständigem Kulturmedium bei 37 °C vorinkubiert.

b. Poly-L-Lysin-Beschichtung für Hippocampus-Primärkulturen

1 mg/ml Poly-L-Lysin VIIB wurden in Borat-Puffer (pH 8,5) gelöst und steril-filtriert. Durch Über-Nacht-Inkubation

bei Raumtemperatur wurde das Poly-L-Lysin an die Unterlage gebunden. Ungebundenes Poly-L-Lysin wurde durch mehrmaliges Waschen (einmal kurz, einmal über Nacht) entfernt und die Platten vor Gebrauch mehrere Stunden (über Nacht) in vollständigem Kulturmedium bei 37 °C vorinkubiert.

c. Poly-L-Lysin-Beschichtung für alle übrigen Primärkultur-Systeme

Poly-L-Lysin Typ II wurde in der Konzentration von 5 ng/ml in H_2O dest. gelöst und steril-filtriert. Die Bindung des Poly-Lysins an die Plastik- oder Glasunterlage erfolgte durch Inkubation bei Raumtemperatur (> 15 Min.). Anschliessend wurde die überstehende Lösung entfernt und die Platten mit Kulturmedium vorinkubiert (37 °C, > 15 Min.).

B. Bestimmung der Zellzahlen

Die Bestimmung der Zellzahlen für alle verwendeten Primärkultursysteme wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen.

C. Primärkulturen aus Ratten-Cerebellum
(Cohen, J. et al., 1974 und 1978)

a. Lösungen zur Kultivierung von Cerebellum

1. KRB Krebs-Ringer Bicarbonat Medium, pH 7,4
10-fach konzentrierte Stocklösung:

70,7 g	NaCl	Merck, Darmstadt
3,6 g	KCl	" "
1,66 g	KH_2PO_4	" "
21,4 g	$NaHCO_3$	" "
25,7 g	Glukose	" "
0,15 g	Phenolrot	" "

auf 1000 ml H_2O dest., pH-Wert Einstellung durch Begasung mit CO_2.

2. Lösung 1 - KRB-BSA

100 ml KRB (einfach konzentriert)
0,3 g BSA
0,8 ml Magnesiumsulfat-Stocklösung (3,8 %)

3. Lösung 2 - Trypsin-Lösung

5 mg Trypsin wurden in 20 ml Lösung 1 gelöst,
Gebrauchskonzentration: 0,025 % Trypsin

4. Lösung 3 - Dispersionslösung

In 20 ml Lösung 1 wurden gelöst:
1 mg DNase
10,4 mg Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen
0,2 ml Magnesiumsulfat-Stocklösung (3,8 %)

5. Lösung 4 - Trypsin-Inhibitor-Lösung

1,6 ml der Dispersionslösung 3 wurden mit Lösung 1 auf 10 ml aufgefüllt.

Steril-filtriertes KRB konnte für etwa 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden, die Lösungen 1 - 4 wurden jeweils am Tag der Cerebellum-Preparation frisch angesetzt.

b. Preparation der Cerebelli zur Kultivierung in Einzelzell-Kultur

Fünf bis sieben Tage alten Ratten wurden die Cerebelli entnommen und mittels eines Skalpells in KRB-BSA zerkleinert. Die Gewebestücke wurden mit Trypsin behandelt (Lösung 2; 15 Min. bei 37 °); die Neutralisation der Trypsin-Wirkung erfolgte durch Addition der Trypsin-Inhibitor-Lösung (Lösung 4). Die Gewebestücke wurden durch kurzes Zentrifugieren (1000 rpm) pelletiert und die Zellen in Lösung 3 durch Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteur-Pipette (20 - 25mal) mechanisch vereinzelt.
Zur Erhöhung der Ausbeute wurden nicht-dissoziierte Zellaggregate durch kurzes Zentrifugieren (1000 rpm) von der Einzelzellsuspension getrennt und nochmals in Lösung 3 mechanisch vereinzelt. Alle Einzelzellen wurden pelletiert

(Zentrifugation 1000 rpm, 10 Min.), in einem kleinen Volumen Kulturmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die zum Ausplattieren eingestellte Zelldichte betrug 1 - 1,5 x 10^6 Zellen/ml Kulturmedium. Zur Kultivierung von Cerebellum-Zellen wurde DMEM mit folgenden Zusätzen verwendet:

10 % FKS
2,5 % Hühnerembryoextrakt
35 mg/ml Glutamin
24 mM KCl

Das Überwachsen der Kulturen durch nicht-neuronale Zellen (hauptsächlich Astrozyten und Fibroblasten) wurde durch Addition des Mitoseinhibitors Cytosin-Arabinosid in einer Endkonzentration von 10^{-5} M (24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen) verhindert.

D. Präparation von Primärkulturen aus dem optischen Nerv und dem Bulbus olfactorius der Ratte

Für beide Primärkultursysteme wurden neugeborene Ratten verwendet. Die Zellen wurden in beiden Fällen wie für das Cerebellum-Kultursystem beschrieben vereinzelt und kultiviert.

E. Primärkulturen aus fötalem und neugeborenem Ratten-Cortex

Rattenembryonen im Alter zwischen 15 und 21 Tagen und neugeborene Tiere im Alter zwischen einem und fünf Tagen wurden für die Präparation der cerebralen Cortices dekaptiert. Die Cortices wurden nach Öffnen der noch weichen Schädeldecke und nach dem Entfernen der Meninges von den anderen Gehirnteilen abgelöst und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Auflösung des Zellverbandes erfolgte enzymatisch bei 37 ^{o}C durch 0,05 % Kollagenase und 0,125 % Trypsin in MEM-HEPES. Nach 15 Min. Inkubationszeit wurde das Dissoziationsmedium erneuert und die Cortex-Stücke weitere 15 Min. bei 37 ^{o}C

inkubiert. Nach weiteren 15 Min. wurde das Medium vorsichtig abgesogen und das verbleibende Gewebe in Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DMEM mit den gleichen Konzentrationen an Trypsin und Kollagenase nochmals 15 Min. bei 37 °C inkubiert - wegen der Konstanthaltung der pH-Wertes in diesem Falle in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO_2 und 95 % Luft. Die enzymatische Auflösung des Zellverbandes wurde durch Addition von 0,5 mg/ml Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen und 40 µg/ml DNase in Ca^{2+}/Mg^{2+}-freiem DMEM beendet. Die Vereinzelung der Zellen erfolgte durch Auf- und Abpipettieren (6-8 Mal) mit einer 10ml-Pipette. Verbleibende Gewebestücke wurden durch Passagieren der Zellsuspensionen durch ein Nylon-Netz (Nr. 125) entfernt. Nach einem Zentrifugationsschritt (400 g für 5 Min.) wurde das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Jeweils 1 - 2 x 10^5 Zellen in 0,5 ml Kulturmedium wurden auf ein Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckgläschen in je einer Vertiefung einer Costar^{24}-Platte ausplattiert. Zur Kultivierung der Cortex-Zellen wurde DMEM versehen mit 15 % FKS, 2 mM Glutamin und 4,5 mg/ml Glukose verwendet.

F. Primärkulturen aus dem Cortex von Hühner- oder Mäuseföten

Zur Kultivierung der Cortices aus Hühnern oder Mäusen wurden 13 bzw. 20 Tage alte Embryonen verwendet. Die Methode zur Vereinzelung der Zellen war die gleiche wie die für Ratten-Cortex beschriebene. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % Pferde-Serum(inaktiviert),2 mM Glutamin, 4,5 mg/ml Glukose, 25 µg/ml Gentamycin und - im Falle der Kulturen aus Hühnerembryonen - zusätzlich mit 2 % Hühnerembryoextrakt kultiviert.

G. Primärkulturen von Zellen aus dem Ischias-Nerv fötaler und neugeborener Ratten (Brockes, J. et al., 1977 und 1979)

Die Ischias-Nerven von 6 - 8 Rattenembryonen oder neugeborenen Tieren wurden in DMEM-HEPES gesammelt und einer

Kollagenase-Behandlung (Endkonzentration 0,05 %) ausgesetzt. Nach 30 Min. bei 37 °C wurde der Kollagenase-Lösung ein gleiches Volumen 0,25 %iges Trypsin hinzugefügt (Endkonzentration der Trypsin-Lösung 0,125 %), und das Gewebe für weitere 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von Serum (10 % Endkonzentration) wurde die Trypsin-Wirkung neutralisiert und das Gewebe durch aufeinanderfolgende Passagen durch Injektionsnadeln der Größen 19, 21 und 25 Gauge dissoziiert. Verbliebene Gewebestücke wurden durch einen Nylonnetz-Filter aus der Zellsuspension entfernt. Aus der Zentrifugation bei 400 g (10 Min.) resultierte ein Zellpellet, das in einem kleinen Volumen Kulturmedium aufgenommen wurde. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension in einer Dichte von 2 - 3 x 10^4 Zellen pro 13 mm Poly-L-Lysin-beschichtetes Deckgläschen (jeweils in einer Vertiefung einer Costar^{24}-Platte) ausplattiert. Das verwendete Kulturmedium war DMEM versehen mit 10 % FKS.

H. Primärkulturen aus fötalen Ratten-Hippocampi

a. Präparation der Hippocampus-Zellen

Zur Kultivierung von Hippocampus-Zellen wurden 18 - 19 Tage alte Rattenembryonen dekaptiert und die Hippocampi von den Cortex-Teilen und von der Meninges getrennt. Die Kollektion der Hippocampi aus Embryonen eines Wurfes erfolgte in DMEM-HEPES. Durch die Einwirkung von Trypsin (0,05 %) und EDTA (0,02 %) wurde der Gewebeverband aufgelöst. Die Wirkung des Enzyms wurde nach Absaugen der Trypsin/EDTA-Lösung durch zweimalige Inkubation des Gewebes (jeweils 5 Min. bei 37 °C) in 10 % FKS in DMEM/HEPES neutralisiert. Die Zellen wurden durch Tituration (je 8 - 10mal) durch Pasteur-Pipetten mit verschiedenen Öffnungsweiten (normal und durch Hitze auf etwa die Hälfte der ursprünglichen Weite verengt) vereinzelt. Nach dem Pelletieren der Zellen (1000 rpm, 5 Min.) wurden diese in DMEM, versehen mit 5 % FKS und 5 % PSI (Plattier-

Medium), aufgenommen und gezählt. In den durchgeführten Experimenten war die Zelldichte eine Variable. Zur effektiven Nutzung der Ausbeute erfolgte die Kultivierung der Zellen in 35 mm-Kulturschalen mit je 7 Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (10 mm Durchmesser) in DMEM mit 5 % FKS und PSI.

b. Herstellen einer Astrozyten-Kultur

Für einige Versuche wurden die auf den Deckgläschen angehefteten Hippocampus-Zellen auf eine Astrozyten-Unterlage übertragen. Diese Gliazellschicht entstand durch Kultivierung der cerebralen Cortices von 1 - 2 Tage alten Ratten. Die Cortices wurden nach der für die Kultivierung von Hippocampus-Zellen beschriebenen Methode vereinzelt und abzentrifugiert. Cortex-Zellen jeweils eines Tieres wurden in 10 ml DMEM, versehen mit 20 % FKS, suspendiert und auf 2 Falcon 50 mm-Kulturschalen verteilt. Nach etwa 5 - 7 Tagen hatte sich der hauptsächlich aus Astrozyten bestehende Zellrasen geschlossen und konnte für die Versuche eingesetzt werden.

1.3. Kultivierung von Lymphozyten für immunologische Versuche

Zur Kultivierung von Lymphozyten wurde RPMI 1640-Medium versehen mit 10 % FKS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und 50 nM Mercaptoäthanol verwendet. (Diesem Medium wird im Text als "vollständiges RPMI-Medium" bezeichnet.)

A. Bestimmung der Zellzahl

Für immunologische Versuche wurde die Anzahl der intakten Zellen einer Population bestimmt. Nur diese Zellen besitzen die Eigenschaft, den Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein-Diacetat an primäre Amingruppen zu binden. Die Anregung des in den Zellen enthaltenen Farbstoffes mit Licht der Wellenlänge 490 nm erlaubt das Auszählen der intakten Zellpopulation in einer Neubauer-Zählkammer.

Methode:
Die zu zählenden Zellen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 Min.) pelletiert und in einem kleinen Volumen RPMI-Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser konzentrierten Zellsuspension wurde mit der Fluorescein-Diacetat-Lösung (5 mg/ml in Aceton) im Verhältnis 1:1 verdünnt, vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Das Auszählen der Zellen erfolgte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm.

B. Gewinnung von intraperitonealen Makrophagen

Interperitoneale Makrophagen unterstützen durch Konditionierung des Kulturmediums das Wachstum der Hybridomazellen und phagozytieren Debris.

Methode:
Balb/c-Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und mit 70 % Äthanol sterilisiert. Zur Sichtbarmachung der Bauchdecke wurde den Mäusen in der Rückenlage das Bauchfell entfernt. Mit je zweimal 5 - 10 ml RPMI-Medium wurden die Makrophagen aus der Bauchöhle eines Tieres gewaschen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 rpm. 10 Min.), zweimal in RPMI-Medium gewaschen und mit Fluorescein-Diacetat gezählt. Aus einer Maus konnten in der Regel 2 - 4 x 10^6 Makrophagen gewonnen werden. Jeweils 0,5 - 2 x 10^5 Zellen/ml vollständigen Kulturmediums wurden als "Feeder-Layer" eingesetzt.

C. Produktion monoklonaler Antikörper

Die Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper durch die Fusion von Myelomazellen und Milzzellen wurde von Köhler und Milstein etabliert (Köhler, G. und C. Milstein, 1975). Das Prinzip der Methode ist dem beigefügten Diagramm zu entnehmen.

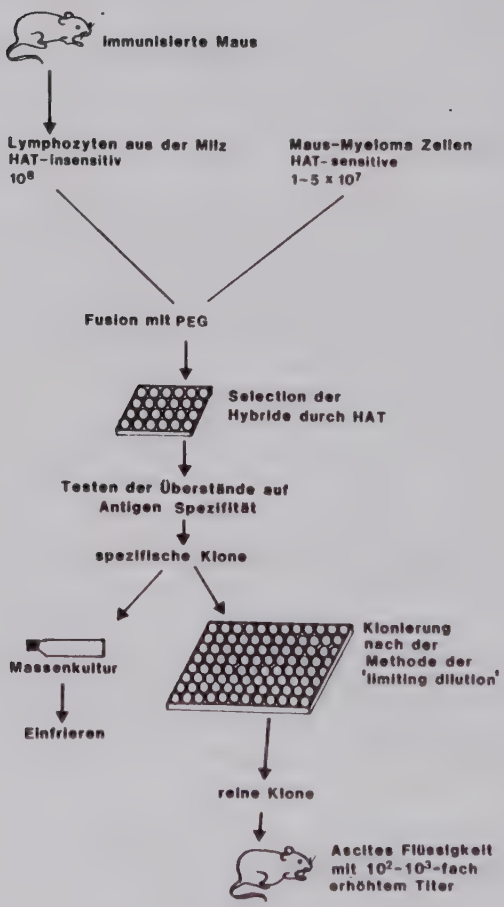


Abb. 1 Herstellung monoklonaler Antikörper durch Fusion von Lymphozyten

a. Immunisierung der Balb/c-Mäuse

100 µl einer synaptischen Plasmamembran (SPM)-Fraktion (1 mg/ml Protein in PBS; die Präparation der synaptischen Plasmamembranfraktion ist unter "Biochemische Methoden" beschrieben) wurde mit dem gleichen Volumen Freund's komplettem Adjuvans vermischt und in die Bauchhöhle je einer Balb/c-Maus injiziert. Nach 10 Tagen wurde die gleiche Menge SPM-Protein in inkomplettem Freund's Adjuvans intraperitoneal appliziert. Acht und elf Wochen später erfolgte das "Boosten" der Mäuse mit jeweils 100 µg SPM-Protein in PBS (i.p.). Vier Tage nach der letzten Injektion wurden die Milzzellen einer so immunisierten Maus zur Fusion mit Maus-Myelomazellen eingesetzt.

b. Fusion von Lymphozyten und Selektion der Hybride

Einer durch Genickbruch getöteten, immunisierten Maus wurde die Milz entnommen und durch ein Sieb in serumfreies RPMI-Medium gestrichen. Größere Gewebestücke setzten sich von der Einzelzellsuspension nach 10 Min. (4 ^{o}C) am Boden eines sterilen Röhrchens ab, Zelldebris wurde durch dreimaliges Waschen (Zentrifugation bei 1000 rpm für je 10 Min., 4 ^{o}C) aus der Zellsuspension entfernt. Nach dem Zählen der Zellen mit Fluorescein-Diacetat (Ausbeute in der Regel 0,5 - 1 x 10^{8} Zellen pro Milz) wurde die Suspension in serumfreiem RPMI bis zur Fusion auf Eis bereitgestellt.
Zellen der Myelomalinie X63Ag8.563 wurden in ihrer logarithmischen Wachstumsphase von ihrer Unterlage gelöst, zweimal mit serumfreiem RPMI-Medium gewaschen (Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 Min.) und mit Fluorescein-Diacetat gezählt.
Ein Teil Myelomazellen wurde mit zehn Teilen Milzlymphozyten wurden zusammengebracht und pelletiert (1000 rpm, 10 Min.). Tropfenweise und unter vorsichtigem Schütteln wurden 0,7 ml Polyäthylen-Glykoll(PEG, 50 % in PBS) addiert und - durch die Detergenzwirkung des PEG - die Membranen der Zellen fusioniert. Das PEG wurde mit serumfreiem RPMI-

Medium ausgewaschen und die Zellen in einer Dichte von etwa 1×10^6 Zellen/ml auf durch intraperitoneale Makrophagen für 24 Stunden vorkonditionierte Costar^{24}-Platten ausplattiert. Zur Selektion der Hybride wurden dem vollständigen RPMI-Medium die folgenden Komponenten zugesetzt:

Komponente	Endkonzentration
Hypoxanthin	1×10^{-4} M
Aminopterin	4×10^{-7} M
Thymidin	$1{,}6 \times 10^{-5}$ M

Nach etwa 7 - 14 Tagen konnte eine Vermehrung der Hybridzellen beobachtet werden. Bei etwa 40 - 50 % Bewachsung der Kulturunterlage wurde das Kulturmedium auf sekretierte, Antigen-spezifische Antikörper getestet (siehe "Immunologische Methoden"). Hybridomazellen , die spezifische Antikörper in das überstehende Kulturmedium sekretierten, wurden durch Klonierung (c.) von den übrigen Zellen isoliert. Nur die reinen Klone wurden als Quelle für die spezifischen monoklonalen Antikörper verwendet.

c. Klonierung Antikörper-produzierender Hybridomazellen

Antikörper-produzierende Hybridomazellen wurden nach der "Limiting-Dilution"-Methode kloniert. Bei 60 - 70 % Bewachsung einer Costar^{24}-Vertiefung wurden die Antikörper-produzierenden Hybridomazellen mit einer sterilen Pasteur-Pipette von ihrer Unterlage abgelöst und mit Fluorescein-Diacetat gezählt. Durch die Wahl einer sehr geringen Zelldichte (3 Zellen/ml Medium) wurde erreicht, daß nur in jeder dritten bis fünften Vertiefung einer mit intraperitonealen Makrophagen vorkonditionierten Costar^{96}-Mikrotiter-Platte ein Klon entstehen konnte. Die gebildeten Klone wurden auf die Produktion spezifischer Antikörper getestet und nur diese wurden hochgezogen. Um absolut reine Klone zu erhalten, wurde zweimal nach der Methode der "Limiting Dilution" kloniert. Die Reinheit der Klone wurde durch intrazelluläre Immunfluoreszenz mit Rhodamin-gekoppeltem, Anti-Maus-Immunoglobin kontrolliert (siehe "Immunologische Methoden").

d. Kultivierung und Lagerung Antikörper-produzierender Klone

Nach der Selektion der Hybride durch Hypoxantin, Aminopterin und Thymidin wurde nach etwa vier Wochen in vitro zunächst das Aminopterin und nach weiteren zwei Wochen auch das Hypoxanthin und Thymidin aus dem Kulturmedium weggelassen.
Die Antikörper-produzierenden Klone wurden nach der Selektionsphase wie Myelomazellen in vollständigem RPMI-Medium in Kultur gehalten. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Klone in 10 % DMSO in vollständigem RPMI-Medium eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei - 180 ^{o}C aufbewahrt. Die Methoden zum Einfrieren und Auftauen der Zellen waren die gleichen wie die für Myelomazellen beschrieben.

e. Produktion von Antikörper-enthaltender Ascites-Flüssigkeit in Balb/c-Mäusen

Makrophagen im Peritoneum von Balb/c-Mäusen (vorzugsweise mehrmals niedergekommene Weibchen) wurden durch Injektion von jeweils 0,5 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan ("Pristan") aktiviert.
Zwischen drei und zwölf Wochen später wurden den so behandelten Tieren etwa 1 x 10^{7} Antikörper-produzierende Hybridomazellen in das Peritoneum eingeimpft. Ein Ascites-Tumor bildete sich in der Regel zwischen 10 und 30 Tagen nach Applikation der Zellen.
Zur Entnahme der Antikörper-enthaltenden Ascites-Flüssigkeit wurde den durch Genickbruch getöteten, mit 70 % Äthanol sterilisierten Mäusen das Bauchfell entfernt. Die Ascites-Flüssigkeit wurde bei geschlossener Bauchdecke mit einer 5 - 10 ml-Spritze, versehen mit einer 19 oder 21 Gauge-Injektionsnadel, aus dem Bauchraum gezogen. Hybridomazellen und Makrophagen wurden durch Zentrifugation (1000 rpm, 10 Min.) aus der Flüssigkeit entfernt und entweder in Kultur gehalten, eingefroren oder zur weiteren Ascites-Produktion in "geprimte" Mäuse injiziert. Zelldebris und sonstige Partikel wurden durch Zentrifugation bei einer Umdrehungszahl von 10000 rpm

entfernt und die zum baldigen Verbrauch bestimmte Ascites-Flüssigkeit mit 0,02 % Natrium-Azid bei 4 °C aufbewahrt. Längerfristige Lagerung der Ascites-Flüssigkeit erfolgte bei -70 °C.

2. Immunologische Methoden

2.1. Immunfluoreszenz

A. Indirekte Immunfluoreszenz für Kulturen aus verschiedenen Teilen des Nervensystems

Die indirekte Immunfluoreszenz-Methode wurde zur Identifizierung der Zellen in Primärkulturen aus verschiedenen Teilen des Nervensystems angewandt. Das Prinzip der Methode beruht auf der Verbindung eines unmarkierten Antikörpers mit dem Zell-spezifischen Antigen und der darauffolgenden Markierung dieses Komplexes durch Bindung eines gegen den unmarkierten Antikörper gerichteten Fluorochrom-konjugierten zweiten Antikörpers.
Die markierten Komplexe können im Fluoreszenz-Mikroskop bei Anregung der Fluorochrom-Konjugate mit Licht der entsprechenden Wellenlängen examiniert werden. Die Anregungswellenlänge für den grün-leuchtenden Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein-Isothiozyanat (FITC) liegt bei 490 nm, die für den rot-leuchtenden Tetramethylrhodaminisothiozyanat (TRITC) bei 510 und 545 nm.
Einige der durch die Antikörper gebundenen Zelltyp-spezifischen Markermoleküle sind auf der Zelloberfläche lokalisiert (z.B. Galaktocerebrosid, Sulfatid, A4-Antigen, RAN 1 und Thy 1.1), andere bilden einen Teil des Zytoskeletts (Glial-Fibrillary-Acidic-Protein). Je nach der Lokalisation der Antigene variierte die Methode im Hinblick auf die Zellfixierung.

a. Material

1. Inkubations- und Waschmedium:
   MEM/HEPES mit 10 % FKS und 0,02 Natrium-Azid

2. Fixiermittel:
   5 % Eisessig/95 % Äthanol

3. Inkubationskammer:
   Als Inkubationskammer wurde ein rechteckiger Plexiglas-Kasten mit aufgeklebtem Eppendorff-Deckelchen als Unterlage für die Deckgläschen benutzt. Die Feuchthaltung erfolgte durch angefeuchtete, an die Kammer-Innenseite angedrückte Kleenex-Tücher.

b. Indirekte Immunfluoreszenz für Membran-Antigene

Auf Glasdeckgläschen aufgeheftete Zellen wurden durch Eintauchen in eine Reihe von fünf mit Waschmedium gefüllten Sterilin Röhrchen gewaschen und anschließend in die feuchte Inkubationskammer gebracht. Die Zellen auf jedem Deckglas wurden für je 30 Min. mit dem entsprechend verdünnten, Zelltyp-spezifischen Antiserum (Tabelle 1) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Wegwaschen der ungebundenen, unmarkierten Antikörper wurden die Fluorochrom-konjugierten Anti-Maus oder Anti-Kaninchen Immunglobuline an die Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden (30 Min., Raumtemperatur). Die Fixierung der Zellen erfolgte nach erneutem Waschen der Kulturen in 5 % Eisessig/95 % Äthanol (10 - 15 Min. bei -20 ^{o}C). Die Präparate wurden gewaschen, mit Glycerol eingedeckt und mit Nagellack luftverschlossen. Die Examinierung der Kulturen erfolgte durch ein Leitz Fluoreszenz-Mikroskop.

c. Indirekte Immunfluoreszenz für intrazelluläre Antigene

Im Unterschied zur Methode für Membran-Antigene, wurden intrazellulär lokalisierte Antigene vor dem Auftragen der Antikörper durch Vorfixierung der Zellen zugänglich gemacht.

Das Fixiermittel setzte sich auch in diesem Falle aus 5 % Eisessig/95 % Äthanol zusammen. Die Zeiten für die Inkubation der Antikörper, die Bedingungen für das Fixieren der Kulturen sowie das fünfmalige Waschen im Anschluß an jeden Inkubationsschritt waren mit der für Membran-Antigene beschriebenen Methode identisch.

d. Indirekte Doppelimmunfluoreszenz

Für indirekte Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen wurden die Kulturen jeweils sequentiell mit den Antikörpern der gewünschten Spezifität und nachfolgend mit den entsprechenden Fluorochrom-Konjugaten inkubiert. Zwischen den einzelnen Antikörper-Inkubationen wurden die Kulturen wie schon beschrieben gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für Membran-Antigene nach Beendigung aller Inkubationsschritte in 5 % Essigsäure/95 % Äthanol bei -20 ^{o}C (10 Min.). Für Doppelfärbungen intra- und extrazellulärer Antigene in und an Zellen der gleichen Kultur wurden zunächst die Membran-Antigene und erst anschließend die intrazellulären Antigene markiert.
Die für Doppelfärbungen verwendeten Fluorochrom-Konjugate wurden auf ihre Kreuzreaktivität mit Immunoglobulinen der nicht gewünschten Spezies oder Immunoglobulin-Klasse getestet. Beim Vorliegen von Kreuzreaktivität wurde diese Aktivität durch Absorption der Konjugate an den kreuzreagierenden Molekülen entfernt.

B. Indirekte Immunfluoreszenz für neurale Zellen in Suspension

Frisch dissoziierte Cortices aus Rattenembryonen und neugeborenen Tieren verschiedenen Alters (III 1.2.E.) wurden nacheinander mit Kaninchen-Antiserum gegen Sulfatid und Rd-GAR-Ig und anschließend mit monoklonalem mGalC-Antikörper und Fl-GAM-IgG inkubiert (30 Min.,Raumtemparatur).

Zwischen jeder Antikörper-Inkubation wurden die Zellen je dreimal gewaschen (Abzentrifugieren der Zellen für jeweils 10 Min. bei 1000 rpm und Wiederaufnahme des Zellpellets in MEM-HEPES mit 10 % FKS und 0,02 % Natriumazid).
Da morphologische Kriterien für Zellen in Suspension wegen ihrer runden Form nicht anwendbar sind, mußte die Möglichkeit der unspezifischen Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Mikrogliazellen ausgeschlossen werden.
In einem Experiment, in dem das Kaninchen-Antiserum gegen Sulfatid und der monoklonale mGalC-Antikörper durch normales Kaninchen- bzw.Maus-Serum substituiert worden war, konnte die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Fc-Rezeptoren der Mikrogliazellen durch die Verwendung von 50% normalem Ziegen-Serum bei allen Inkubationsschritten aufgehoben werden. Für die Färbungen in Zellsuspensionen erfolgte daher die Bindung aller Antikörper in Gegenwart von MEM-HEPES mit 50 % Ziegen-Serum und 0,02 % NaN_3.

C. Direkte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Antikörper-Produktion der Hybridoma-Zellen

Die direkte Immunfluoreszenz-Methode wurde zur Überprüfung der Reinheit der Antikörper-produzierenden Hybridomaklone angewandt. Bei dieser Methode werden von den Hybridoma-Zellen synthetisierte Immunglobuline nach dem Fixieren der Zellen durch einen Fluorochrom-konjugierten Antikörper gegen Maus-Immuglobuline zugänglich gemacht. Bei Examinierung der Hybridoma-Zellen im Fluoreszenz-Mikroskop können die Antikörper-produzierenden Zellen von den nicht-produzierenden Zellen aufgrund der Fluorochrom-Markierung unterschieden werden.

a. Material

1. Inkubations- und Waschpuffer (PBSF)
   PBS mit 1 % BSA und 0,01 % Natriumazid

2. Fixiermittel
   100 % Äthanol

b. Durchführung

Zu untersuchende Zellen wurden auf einem Objektträger angetrocknet und anschließend für 5 Min. in 100 % Äthanol (Raumtemparatur) fixiert. Nach dem Waschen mit PBSF (Eintauchen der Objektträger in eine Reihe von 5 mit PBSF gefüllten Färbeküvetten) wurden die Zellen für 20 - 30 Min. mit Fluorochrom-markiertem Anti-Maus-Immunglobulin inkubiert (Raumtemparatur) und anschließend erneut gewaschen. Die Präparate wurden mit Glycerol eingedeckt und mit Nagellack luftverschlossen. Antikörper-synthetisierende Hybridoma-Zellen konnten aufgrund ihrer Fluorochrom-Markierung identifiziert werden.

2.2. Adsorption von Immunglobulinen

A. Adsorption von Immunglobulin an kreuzreagierende, Sepharose-gekoppelte Proteine

Für die Doppelimmunfluoreszenz-Markierungen war die absolute Spezifität der Fluorochrom-konjugierten Immunglobuline eine unbedingte Voraussetzung für die Durchführung der Experimente. Überlappende Bindungsaktivitäten der Fluorochrom-markierten, Spezies-spezifischen Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper mit der jeweils unerwünschten Spezies, oder im Falle von Klassen-spezifischem Anti-Maus-Immunglobulin mit der jeweils unerwünschten Immunglobulin-Klasse, wurde durch Adsorption der nicht erwünschten Aktivität an immobilisierten, kreuzreagierenden Immunglobulinen entfernt.

a. Kopplung von Immunglobulin an CNBr-aktivierte Sepharose

Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B (1g) wurde auf einem Büchner-Trichter mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen (10 - 15 Min.). Das zu koppelnde Immunglobulin wurde in 0,1 M $NaHCO_3$-Puffer mit 0,5 M NaCl (pH 8,3) in einer Konzentration

von 3 mg Protein/ml Puffer gelöst, pro ml Sepharose-Gel wurden 9 mg Immunglobulin eingesetzt. Die Gel-Protein-Mischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das ungebundene Protein durch Zentrifugation entfernt (200 g, 10 Min.) und aktive Gruppen auf dem Sepharose-Gel durch Inkubation mit 1 M Äthanolamin in Bicarbonat-Puffer (2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C) blockiert. Überschüssiges Protein und Äthanolamin wurden durch aufeinanderfolgende Waschvorgänge bei pH 8,3 (Bicarbonat-Puffer), pH 4,0 (0,1 M Acetat-Puffer mit 0,5 M NaCl) und nochmals pH 8,3 aus der Gel-Suspension entfernt. Die gekoppelte Sepharose wurde bis zum Gebrauch in PBS mit 0,02 % Natriumazid bei 4 °C aufbewahrt.

b. Adsorption von Fluorochrom-konjugiertem Immunglobulin an kreuzreagierendes, Sepharose-gekoppeltes Immunglobulin

Fluorochrom-Konjugate wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem an Sepharose gekoppelten, kreuzreagierenden Immunglobulin zusammengebracht, vermischt und über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Trägermaterial vorsichtig sedimentiert (200 g, 10 Min.) und das Fluorochrom-markierte Immunglobulin im Überstand durch Zentrifugation bei einer höheren Umdrehungszahl (8000 rpm, 10 Min.) von Aggregaten und verbliebenen Gel-Partikeln befreit.
Der Erfolg der Adsorption wurde durch indirekte Immunfluoreszenz überprüft.

B. Adsorption von Immunglobulin an Zellmembranen aus dem Rattengehirn

Einige Fluorochrom-Konjugate zeigten bei Anwendung in neuralen Kulturen eine unspezifische Hintergrundfärbung. Diese Aktivität konnte in der Regel durch Adsorption an neurale Zellmembranen entfernt werden.

Das gesamte Gehirn einer neugeborenen Ratte wurde mittels eines Skalpells zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in PBS homogenisiert und die löslichen Proteine von Membran-Partikeln durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorff-Zentrifuge). Nach mehrmaligem Waschen der Membranen wurden gleiche Volumina Hirngewebe und Fluorochrom-Konjugat vermischt und für mindestens 60 Min. geschwenkt (Kühlraum). Nach dieser Zeit wurde das Konjugat sorgfältig von allen Partikeln befreit (Zentrifugation in der Eppendorff-Zentrifuge) und auf Hintergrundfärbung überprüft.

2.3. Immunenzymatische Methoden

A. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Diese zuerst von Engvall und Perlmann (Engvall, E. and P. Perlmann, 1971) beschriebene Methode wurde bei der Produktion monoklonaler Antikörper zum Testen der Hybridoma-Kulturüberstände angewandt. Das Prinzip der Methode ist in der folgenden Schema-Zeichnung dargestellt:

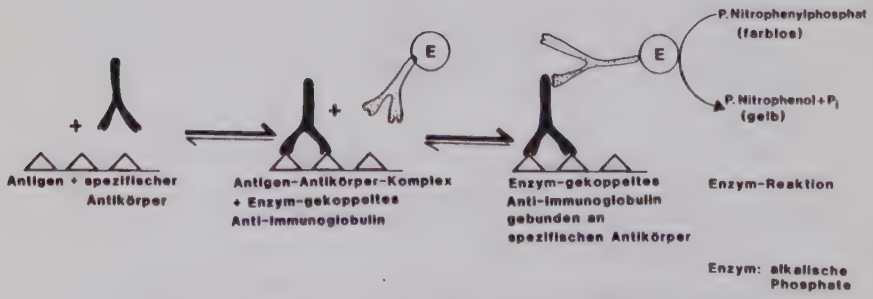


Abb.2 Reaktionsschema des ELISA

Protein-Antigene werden an Polyvinylchlorid-Mikrotiter-Platten gebunden, unbesetzte Bindungsstellen werden mit Albumin abgesättigt. Die von den Hybridoma-Zellen in das überstehende Kulturmedium sekretierten Maus-Antikörper binden an die Antigene; mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Maus-Immunglobuline reagieren mit dem Antigen-Antikörper-Komplex. Durch Abspaltung der Phosphatgruppe vom Enzymsubstrat p-Nitrophenylphosphat durch die Wirkung der an die Komplexe gebundenen alkalischen Phosphatase entsteht eine Gelbfärbung, die die Bindung Antigen-spezifischer Antikörper indiziert.

a. Material

1. Wasch und Inkubationspuffer (BBS):
   Borat-gepufferte Saline, pH 8,2

   6,20 g Borsäure
   5,02 g Na-Tetraborat
   4,4 g NaCl auf 1000 ml H_2O dest.

2. Substrat-Puffer:

   48 ml Diäthanolamin
   400 ml destilliertes Wasser
   24,5 ml Magnesiumchlorid

   pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter HCl; mit H_2O dest. wurde das Volumen auf 500 ml gebracht.

b. ELISA für Protein-Antigene (Synaptische Plasmamembran-Fraktion

Jeweils 100 µl einer 10 µg/ml SPM-Protein-Suspension wurden in je einer Vertiefung einer Cooke Polyvinylchlorid-Mikrotiter-Platte bei 4 ^{o}C über Nacht inkubiert. Danach wurde das ungebundene Protein entfernt und die noch freien Bindungsstellen in jeder Vertiefung mit je 200 µl einer 1 %igen BSA-Lösung (in BBS) blockiert (eine Stunde bei Raumtemperatur) Nach dreimaligem Waschen mit BBS wurden 50 - 100 µl unverdünnte Hybridoma-Kulturüberstände addiert und für

6 - 8 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen und die mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Maus-Immunglobuline über Nacht (4 °C) an die Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden. Zur Erfassung monoklonaler Antikörper aller Immunglobulin-Klassen wurden die Tests auf Antikörper-Produktion der Hybridoma-Zellen mit einer Mischung Phosphatase-gekoppelter Antikörper durchgeführt: Anti-Maus Immunglobuline der Klassen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und Immunglobuline gegen die leichten Ketten κ und λ wurden jeweils 1:500 bzw. 1:200 verdünnt eingesetzt. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl des Enzymsubstrats p-Nitrophenylphosphat in Substrat-Puffer (1 mg/ml) addiert und nach 10 - 30 Min. der Farbumschlag für Antigen-spezifische Antikörper registriert.

c. Kopplung der alkalischen Phosphatase an Immunglobuline

Für die vorliegende Arbeit wurde Anti-Maus - Immunglobulin der Klasse IgG3 (von Dr. P. Burrows) und Anti-Kaninchen-Immunglobuline (von Nordic) mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Bei beiden Substanzen handelte es sich um gereinigte Proteine. Jeweils 0,5 mg Immunglobulin wurden mit 1,5 mg alkalischer Phosphatase zusammengebracht (0,2 ml Volumen) und über Nacht gegen PBS dialysiert. Das Dialysat wurde mit PBS auf 0,5 ml Volumen gebracht und zu dieser Lösung Diglutaraldehyd (Merck) in einer Endkonzentration von 0,2 % addiert. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt (2 ml Endvolumen) und überschüssiges Glutaraldehyd gegen PBS ausdialysiert (über Nacht, 4 °C). Das gekoppelte Immunglobulin wurde mit 0,05 M TRIS-Puffer, versehen mit 1 mM $MgCl_2$, 0,04 % NaN_3 und 5 % BSA, auf 10 ml aufgefüllt und in Aliquots zu 1 ml bei 4 °C aufbewahrt. Beide Konjugate wurden auf Kreuzreaktivitäten und Hintergrundfärbung getestet und austitriert. Anti-Maus-IgG_3 zeigte keine Kreuzreaktion mit anderen Anti-Maus oder -Kaninchen-Immunglobulin-Klassen ,

Anti-Kaninchen-Ig nicht mit Maus-Immunglobulinen . Hintergrundfärbung auf Plastik wurde nicht beobachtet und die Proben konnten bis zu einer Verdünnung von 1:500 verwendet werden.

B. Indirekte Immunperoxidase-Färbung
(Graham, R.C. and Karnovsky, M.J., 1966)

Die Immunperoxidase-Technik wurde in einigen Experimenten zur Identifizierung von Zellen in vitro eingesetzt. Die Methode beruht auf Sichtbarmachung der Bindung zellspezifischer Antikörper durch Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Immunglobuline . Das durch die Peroxidase gebildete Oxidationsprodukt des Diaminobenzidins bildet einen feinen granulären Belag um die von Antikörpern besetzten Stellen.

Neurale Kulturen auf Glasdeckgläschen wurden in 2 % Paraformaldehyd in PBS (Ca^{2+}, Mg^{2+}-frei) für 30 Min. fixiert. Zunächst wurde die endogene Peroxidase-Aktivität der Zellen durch Inkubation mit 0,3 % Wasserstoff-Peroxid abgesättigt. Die folgenden Inkubationsschritte wurden nacheinander für jeweils 30 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt und jeweils durch das Waschen der Kulturen (Eintauchen in eine Reihe von 5 mit PBS gefüllten Sterilin-Röhrchen) abgeschlossen. Nacheinander wurden an die Zellen gebunden: Tetanustoxin (4 mg/ml in PBS), Maus-Anti-Tetanustoxin (1:100 in PBS) und Peroxidase-gekoppeltes Anti-Maus-Immunglobulin (1:50 in PBS). Die Enzymreaktion - Umsetzung des Diaminobenzidins (0,5 mg/ml in 0,5 M TRIS, pH 7,6) und des Wasserstoff-Peroxids (0,1 % im gleichen Puffer) - lief für 15 - 20 Min. bei Raumtemperatur ab. Die Kulturen wurden in Glycerol eingedeckt und mit Nagellack luftverschlossen.

2.4. Adsorption von Antiseren an Sphingolipid-enthaltende Cholesterol/Lecithin-Mizellen

Die Adsorption von Antiseren an in Mizellen eingebaute Sphingolipide wurde als Test zur Charakterisierung von Antiseren gegen Lipid-Antigene verwendet (Niedick, B., 1975).

a. Herstellen der Sphingolipid-enthaltenden Cholesterol/Lecithin-Mizellen

Aus Stocklösungen der Lipide (1 mg/ml in Chloroform) wurden jeweils 2,9 mg Sphingolipid mit 1,3 mg Cholesterol und 2,7 mg Lecithin zusammengebracht und diese Mischung unter Stickstoff eingetrocknet. Der abgesetzte Rest wurde unter vorsichtigem Erwärmen auf 45 °C (Wasserbad) mit 0,5 ml Äthanol aufgenommen und in 4,5 ml PBS resuspendiert. Cholesterol/Lecithin-Mizellen ohne Sphingolipid wurden für Kontroll-Experimente hergestellt. Bis zum Gebrauch wurde die Lipid-Suspension bei 4 °C aufbewahrt.

b. Adsorption der Antiseren an die Sphingolipid-enthaltenden Mizellen

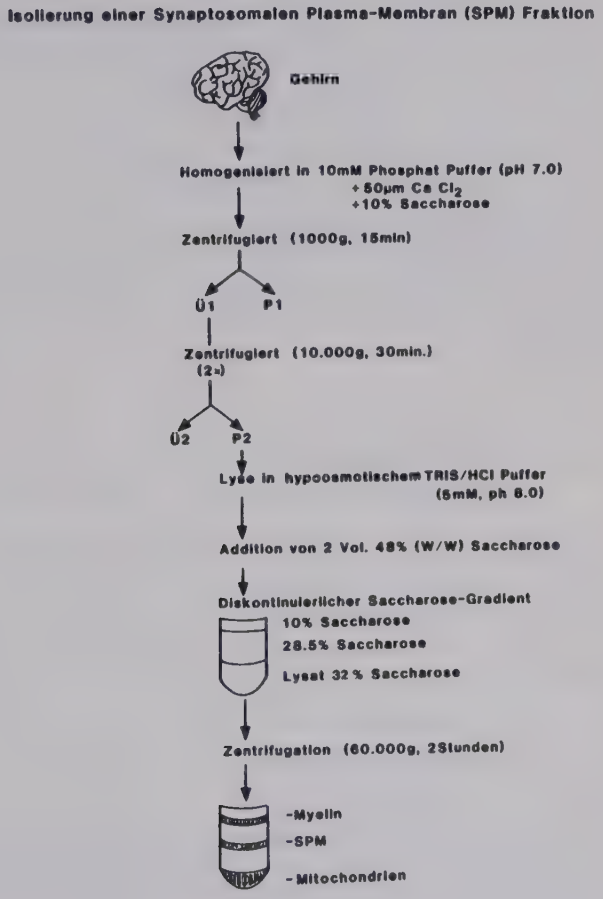
Zwei Kaninchen-Antiseren sowie die Überstände zweier Hybridoma-Klone wurden in einer Verdünnung von 1:5 in einem Volumenverhältnis 1:1 mit der Lipid-Suspension vermischt und zunächst für zwei Stunden bei 37 °C, danach über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Lipid-Mizellen bei 15 000 g (30 Min.) abzentrifugiert und die Überstände ohne weitere Verdünnung mit der indirekten Fluoreszenzmethode auf zwei Wochen alten Cerebrum-Kulturen getestet.

3. Biochemische Methoden

3.1. Präparation einer synaptischen Plasmamembran-Fraktion

Synaptische Plasmamembranen (SPM) wurden nach der von Jones and Matus beschriebenen Methode (Jones, D.H. and A.I.

Matus, 1974) präpariert. In der folgenden Schemazeichnung sind die einzelnen Schritte übersichtlich dargestellt.



Das als Quelle für die SPM-Präparation dienende Gehirngewebe wurde unter Kühlung homogenisiert (10 mM Phosphat-Puffer - pH 7 - mit 50 mM $CaCl_2$ und 10 % Saccharose). Zunächst wurde die Kern-Fraktion durch Zentrifugation (1000 g, 10 Min.) entfernt. Der resultierende Überstand wurde zweimal gewaschen (Zentrifugation bei 10000 g für jeweils 30 Min.) und das SPM-enthaltende Pellet anschließend in hypoosmotischem TRIS-Puffer (5 mM TRIS/HCl pH 8,0) lysiert (60 Min.). Mit einer 48 %igen Saccharose-Lösung wurde die Zucker-Konzentration der Probe auf 32 % eingestellt und in Zentrifugen-Bechern durch Überschichten mit Zuckerlösungen der Konzentrationen 28,5 % und 10 % ein diskontinuierlicher Zuckergradient aufgebaut. Die Synaptosomen-Fraktion sammelte sich nach zweistündiger Zentrifugation (60000 g, 2 Stunden) an der 32 % - 28,5 % Interphase des diskontinuierlichen Zucker-Gradienten, die Myelin-Fraktion an der 28,5 % - 10 % Phasengrenze an.

3.2. Protein-Bestimmung nach Lowry (Lowry, O.H. et al., 1958)

Das Protein von 20 - 100 µl Proben wurde mit 180 - 900 µl eiskalter Trichloresssigsäure ausgefällt (30 Min. auf Eis), pelletiert (Eppendorff-Zentrifuge) und für 10 Min. (37 °C) mit 100 µl 1 N NaOH und 30 µl 10 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) behandelt. Ein ml einer aus

50 ml 2 % Na_2CO_3
1 ml 2 % Na-K-Tartrat
1 ml 1 % $CuSO_4$

bestehenden Lösung wurde mit der Protein-Lösung vermischt und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 100 µl Folin-Chioclateau Phenol-Reagenz (2 ml vermischt mit 4 ml H_2O dest.) hinzugefügt und die Proben zunächst für 30 Min. bei 37 °C, danach für weitere 10 Min. bei Raumtemperatur entwickelt. Die Extinktion der Proben

wurde bei einer Wellenlänge von 579 nm im Spektral-Photometer bestimmt. Die Ermittlung des Proteingehalts der Proben erfolgte anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve.

3.3. Bestimmung der 2',3'-cyclischen Nukleotid 3'-Phosphohydrolase(CNPase)-Aktivität

Der Enzymtest verlief nach folgendem Reaktionsschema:

1. 2'3'-cNADP $\xrightarrow[\text{(pH 5,5)}]{\text{CNPase}}$ 2'-$NADP^+$

2. 2'-$NADP^+$ + Glucose-6-Phosphat $\xrightarrow[\text{dehydrogenase (pH 7,5)}]{\text{Glucose-6-Phosphat-}}$ NADPH + H^+ + Gluconolacton-6-Phosphat

Lösungen:

1. 10 mM 2',3'-cNADP in 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 5,5
2. 5 mM Glucose-6-Phosphat und 30 nM $MgCl_2$ in 250 mM TRIS/HCl-Puffer, pH 7.5
3. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase verdünnt 1:10 mit H_2O dest.

Durchführung des Tests:

Je 18 µl der 2',3'-cNADP-Lösung wurden mit je 2 µl der zu messenden Proben vermischt und für 60 Min. bei 37 ^oC inkubiert. Die Reaktion wurde durch Eintauchen der Proben in ein kochendes Wasserbad (1 Min.) abgebrochen. Die Umsetzung des entstandenen $NADP^+$ zu $NADPH_2$ wurde - nach Zugabe von 360 µl Glucose-6-Phosphat-Lösung - durch Addition von 20 µl Dehydrogenase zu jeder der auf Raumtemperatur abgekühlten Proben gestartet. Nach 30 Min. Reaktionszeit (bei Raumtemperatur) konnte das entstandene $NADPH_2$ spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden.
Die Enzymaktivität wurde anhand einer Eichkurve, in der variierende Konzentrationen $NADPH_2$ gegen die dazugehörige optische Dichte bei 340 nm aufgetragen worden waren, bestimmt und auf mg Protein bezogen.

3.4. Bestimmung der Succinat-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität

Als Mitochondrien-assoziiertes Enzym reduziert Cytochrom c-Reduktase (E.C. 1.3.99.1) unter Valenzwechsel des Eisens das Cytochrom c der Atmungskette. Die reduzierte Form des Cytochrom c hat bei einer Wellenlänge von 550 nm ein Absorptionsmaximum, welches - bei Hemmung des weiteren Ablaufs der Elektronentransportkette - zur Bestimmung der Cytochrom c-Reduktase-Aktivität ausgenutzt werden kann. In dem hier beschriebenen Testansatz wurde durch Rotenon die Umsetzung von Produkten aus dem Intermediärstoffwechsel blokkiert; als Wasserstoffdonor wurde das einfach in die Atmungskette einzuschleusende Succinat angeboten.

Durchführung des Tests:

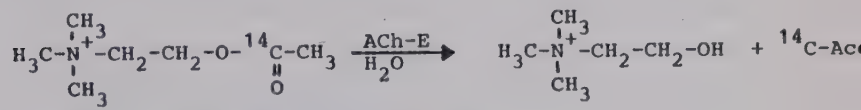
Für den Testansatz wurden folgende Substanzen in einem Eppendorff-Röhrchen gemischt:

300 µl	Cytochrom c in Phosphat-Puffer (67 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0; 0,4 mM KCN 0,13 mM Cytochrom c)
20 µl	H_2O dest.
40 µl	zu testende Enzymprobe
4 µl	Rotenon (0,15 mM)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Na-Succinat (30 mM in H_2O dest.) initiiert. Die Änderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm wurde in 15 Sek. Intervallen über 75 Sekunden verfolgt. Die Bestimmung der Enzymeinheiten erfolgte aus einer Eichkurve, zu deren Erstellung variierende Konzentrationen Succinat mit Dithiothreitol vollständig reduziert und die Mengen reduziertes Succinat mit den optischen Dichten bei 550 nm in Beziehung gesetzt worden waren.

3.5. Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität (Rappoport, F. et al., 1959)

Acetylcholinesterase hydroysiert die Esterbindung des Neurotransmitters Acetylcholin , es entsteht Cholin und Acetat. In dem hier beschriebenen Enzymtest wurde radioaktiv markiertes Acetylcholin eingesetzt:



^{14}C-Acetylcholin Cholin

Das gebildete ^{14}C-Acetat wurde in dem hier durchgeführten Test von dem nicht umgesetzten ^{14}C-Acetylcholin an einem Kationen-Austauscher abgetrennt. Bei einem pH von 6,8 konnte das radioaktive Acetat mit H_2O von der Säule eluiert werden, während das Acetylcholin unter diesen Bedingungen an die Säule gebunden blieb.

Durchführung des Tests:

Jeweils 10 µl des zu testenden Homogenats (Fraktionen eines Saccharose-Gradienten) wurden mit je 10 µl einer Mischung folgender Zusammensetzung zusammengebracht:

^{14}C-Acetylcholin (100 nCi/µl)	0,5 µl
Acetylcholin-HCl (40 mM)	1 µl
NaCl (1 M)	4 µl
H_2O	4,5 µl
	10 µl

Dieser Testansatz wurde für 20 Min. bei 37 °C inkubiert, nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit 1 ml Eserin-Sulfat (200 µM, 4 °C) terminiert. Die Proben wurden auf Dowex 50 W x 8 Säulen (3 cm Säulenlänge) aufgetragen und mit 3 ml H_2O dest. eluiert. Das Eluat wurde direkt in Szintillationsgläschen aufgefangen, mit 5 ml Unisolve-100 aufgefüllt und im Szintillationszähler gezählt.

In jedem Testansatz wurde die eingesetzte Menge an Radioaktivität als Bezugswert mitgezählt (erhaltene cpm entsprechen 40 nM Acetylcholin). Für die Kontrollen wurde jeweils ein Aliquot des zu testenden Homogenats inaktiviert (Kochen der Proben für 5 Min.) und wie beschrieben getestet; der so erhaltene Blindwert wurde von dem jeweiligen für die Proben erhaltenen Wert subtrahiert. Alle Proben wurden dreifach angesetzt, die in den Ergebnissen angegebenen Daten sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen.

3.6. Dünnschicht-Chromatographie von Lipiden

A. Qualitative Dünnschicht-Chromatographie (E. Svennerholm and L. Svennerholm, 1963)

Die Reinheit der in der Arbeit verwendeten Sphingolipide wurde durch Dünnschicht-Chromatographie überprüft.
Je 250 µl der Lipid-Stocklösungen (100 µg/ml in Chloroform/Methanol (1:1, v/v)) wurden unter Stickstoff evaporiert und durch Aufnahme in je 25 µl des gleichen Lösungsmittles konzentriert. Mittels eines Auftragegeräts wurden auf zuvor aktivierte (30 Min. bei 110 ^{o}C im Trockenschrank) Silicagel G 60 Platten (10 x 20 cm) jeweils 25 µg jedes Lipids aufgetragen. Der Lauf erfolgte in einer zuvor mit Laufmittel gesättigten Chromatographie-Kammer in Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 65:25:4 (v/v/v). Die Platte wurde nach dem Trocknen unter dem Abzug mit 50 % Schwefelsäure (in Wasser) besprüht und bei 180 ^{o}C im Trockenschrank entwickelt. Lipide zeigten sich als schwarze Banden.

B. Präparative Dünnschicht-Chromatographie

Für die präparative Dünnschicht-Chromatographie wurden jeweils 25 µg, 100 µg und 25 µg desselben Lipids nebeneinander auf aktivierte Dünnschicht-Platten (20 x 20 cm) aufgetragen

und wie bei der qualitativen Methode beschrieben getrennt. Nach dem Trocknen und vor dem Besprühen wurden die Laufbahnen der 100 µg-Proben mit Pappstreifen abgedeckt. Um das Erhitzen der Proben auf 180 °C zu umgehen, wurde als Sprüh-Reagenz Primulin (EGA-Chemie, Stocklösung (100 mg in 100 ml H_2O dest.) verdünnt 1:100 in Aceton/H_2O (4:1)) verwendet. Die Banden wurden unter dem UV-Monitor bei Licht der Wellenlänge 366 nm sichtbar gemacht und ihre Lage markiert. Die einer Bande entsprechenden, zwischen zwei markierten Banden des gleichen Lipids lokalisierten unmarkierten Flächen wurden ausgekratzt, in jeweils 750 µl Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und für zwei Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach dem Abzentrifugieren des Silicagels (10 Min., 1500 rpm bei -10 °C) wurden die gereinigten Lipide für Tests auf die Antigen-Spezifität verschiedener Antiseren in einem modifizierten Enzyme-linked Immnosorbent Assay verwendet.

4. Elektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie (EM) wurde von den Mitarbeitern der EM-Abteilung des Max-Planck-Instituts für Virusforschung unter Anleitung von Herrn Dr. Frank durchgeführt. Ein Aliquot der verschiedenen bei der Isolierung von synaptischen Plasmamembranen erhaltenen Fraktionen wurde für zwei Stunden (Raumtemperatur) in 2,5 % Glutardialdehyd (in PBS) fixiert und danach mehrmals mit PBS gewaschen. Nach der sich anschließenden Fixierung mit OsO_4 (1 % in H_2O dest., 1 Std. bei RT) und dem Auswaschen des Fixiermittels mit H_2O erfolgte die Einbettung der Zellfraktionen in Agar (2 % in H_2O bidest.). Die Proben wurden unter Zwischenschaltung der Uranylacetat-Blockkontrastierung (2 % Uranylacetat in 70 % Alkohol, 60 Min. bei RT im Dunkeln) in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 95, 100 Prozent) entwässert und in Gelantine-Kapseln in Epon eingebettet.

Die Polymerisierung des Epons erfolgte bei 60 °C über 48 Stunden. Von jeder Probe wurden Ultradünnschnitte (900 - 1000 Å, silber) angefertigt, die auf mit Pioloform-Folie beschichteten Kupfernetzchen aufgefangen wurden. Examiniert wurden die Schnitte mit einem Siemens Elmiskop 102 Elektronenmikroskop.

5. Photographie

Phasenkontrast-Aufnahmen von lebenden Zellen wurden mit einer auf ein Leitz-Diavert-Mikroskop aufgebauten Leicaflex-Kamera mit Ilford Pan F-Filmen (21 Din) photographiert.
Für Fluoreszenz-Photographien wurden die markierten Zellen mit einer auf ein Leitz-Diavert-Fluoreszenz-Mikroskop aufgepaßten Orthomat-Kamera mit 27 Din-Filmen (Ilford HP oder Kodak Ektachrom 400) aufgenommen.
Das Entwickeln der Filme und das Herstellen der Schwarz/Weiß-Abzüge erfolgte durch das Photolabor des Max-Planck-Instituts für Virusforschung (Leiter Dr. H. Frank). Die Abzüge der Farbbilder sind Facharbeiten eines Tübinger Photohändlers.

IV. ERGEBNISSE

Teil I. UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG VON OLIGODENDROZYTEN UND SCHWANN-ZELLEN

1. Herstellung monoklonaler Antikörper

1.1. Präparation des Antigens

Das Ausgangsmaterial für die Herstellung monoklonaler Antikörper bildete eine synaptische, aus Rinder-Hippocampus isolierte Plasmamembran-Fraktion. Für eine Präparation (es wurden insgesamt 6 Präparationen angefertigt) wurden die Hippocampi aus 6 - 8 Gehirnen frisch geschlachteter Rinder (entspricht ca. 60-80 g Frischgewicht) entnommen, zerkleinert (Mixer) und in Phosphat-Puffer (10mM, pH 7,4) mit 10 % Saccharose und 50 µM $CaCl_2$ homogenisiert. Durch differentielle Zentrifugation wurden Kerne (1000 g-Sediment, P1) und lösliche Proteine (10 000 g-Überstand, S2) aus der Präparation abgetrennt. In einer hypoosmotischen Umgebung (5 mM TRIS/HCl, pH 8,0) erfolgte die Lyse der Synaptosomen der P2-Fraktion. Die synaptosomale Plasmamembran-Fraktion wurde von Myelin und Mitochondrien durch einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (32 % - 28,5 % - 10 % Saccharose) abgetrennt und sammelte sich nach zweistündiger Zentrifugation bei 60.000 g an der 32 % - 28,5 % Phasengrenze an. Die dem Proteingehalt entsprechende optische Dichte bei 280 nm über einen typischen Gradienten (1 ml-Fraktionen) ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Peakfraktionen wurden gesammelt und ihr Proteingehalt nach der von Lowry beschriebenen Methode bestimmt. In der Regel lag die Ausbeute an synaptischen Plasmamembranen bei 1 mg SPM-Protein/g Hirngewebe (Naßgewicht).

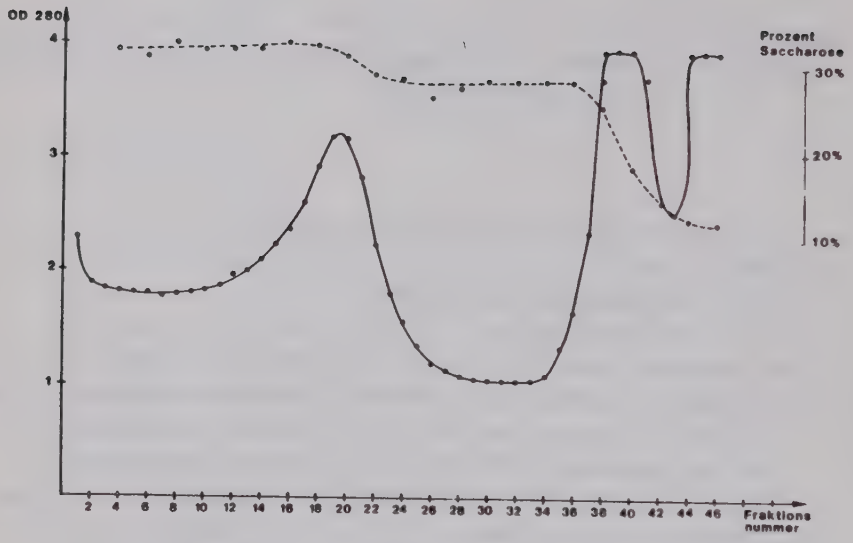


Abb.4 OD_{280} eines zur Isolierung von synaptischen Plasmamembranen (SPM) verwendeten Saccharose-Gradienten: Die SPM-Fraktion sammelt sich an der 32 % - 28,5 % Phasengrenze an (Fraktionen 14 - 24); Myelin konzentriert sich als "schwere" (Fraktionen 37 - 42) und "leichte" (Fraktionen 44 - 46) Fraktion an der 28,5 % - 10 % Grenze. Das Pellet besteht aus Mitochondrien.

1.2. Charakterisierung der Antigen-Fraktion

A. Biochemische Analyse

Bei der Zellfraktionierung stehen verschiedene Enzymtests zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Fraktionen zur Verfügung. Die drei bei der Präparation erhaltenen Fraktionen synaptische Plasmamembranen , Myelin und Mitochondrien wurden aufgrund ihrer Markerenzyme auf gegenseitige Konta-

mination untersucht. Als Markerenzyme sind beschrieben worden: Acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7.) für synaptische Plasmamembranen , Succinat-Cytochrom c-Reduktase (E.C. 1.6.99.3) für Mitochondrien und 2'3'-cyclische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.37) für Myelin (C.W. Cotman and D.A. Matthews, 1971). In Tabelle 1 sind die spezifischen Enzymaktivitäten der einzelnen Fraktionen einer Präparation in Einheiten/mg Protein (1 Enzym-Einheit (Unit) entspricht 1 µMol hydrolysiertem Substrat bzw. gebildetem Produkt Min^{-1} bei 37°C) aufgeführt. Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um die Mittelwerte von jeweils 3 Messungen von 3 separaten Proben.

Tabelle 3: Spezifische Aktivitäten verschiedener Markerenzyme in den Peakfraktionen des diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten

	Acetylcholin-Esterase (U/mg)	Succinat-Cyt.c-Reduktase (U/mg)	c-Nukleotid-3'-Phosphod. (U/mg)
SPM	0,039	0,000	0,431
Myelin	0,025	0,000	1,103
Mitochondrien	0,000	0,041	0,595

Die maximale Acetylcholinesterase-Aktivität befindet sich in der SPM-Fraktion; 64 Prozent dieser maximalen Aktivität sind jedoch auch in der Myelin-Fraktion zu finden. Das Myelinmarkerenzym 2'3'-cyclische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase hat seinen höchsten Wert wie erwartet in der Myelin-Fraktion. Aktivität konnte jedoch auch in der SPM- und Mitochondrien-Fraktion gemessen werden (39 bzw. 53 Prozent der maximalen Aktivität). Succinat-Cytochrom-c-Reduktase konnte nur in der Mitochondrien-Fraktion bestimmt werden. Die vorliegenden Daten erlauben die Aussage, daß die SPM-Fraktion frei von Mitochondrien ist, jedoch mit Myelinfragmenten verunreinigt ist.

B. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die einzelnen subzellulären Fraktionen wurden vom Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Max-Planck-Instituts für Virusforschung (Leiter Dr. H. Frank) einer elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Aliquots der Mitochondrien-, synaptischen Plasmamembran- und der Myelin-Fraktion wurden in 2,5 Prozent Glutardialdehyd und in 1 Prozent OsO_4 fixiert und anschließend entwässert und kontrastiert. Nach der Einbettung der Fraktionen in reines Epon (über Propylenoxid und Propylenoxid/Epon als Zwischenstufen) wurden 900-1000 Å dünne Schnitte angefertigt, diese Ultradünnschnitte wurden auf mit Pioloformfolie (0,25 % Pioloform in Dichloräthan) beschichteten Kupfernetzchen aufgefangen. Mikroskopiert und photographiert wurde unter einem Siemens Elmiskop 102 mit eingebauter Kamera. In Abb. 5, 6 und 7 sind die einzelnen Fraktionen in 72 000-facher Vergrößerung photographisch dargestellt.

Die Abbildung 5 zeigt die Heterogenität der Strukturen in der synaptischen Plasmamembran-Fraktion. Neben den zum Teil noch Vesikel enthaltenden synaptischen Strukturen (S) existieren kleinere Myelinfragmente (M) sowie einige nicht mit Sicherheit zu identifizierende Partikel in der Größe der Synaptosomen. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen um Membranstrukturen des endoplasmatischen Reticulums und des Axolemmas. In b, c und d der gleichen Abbildung sind Beispiele isolierter, noch zusammenhängender synaptischer Plasmamembranen vergrößert dargestellt, die postsynaptischen Verdickungen und die präsynaptischen Vesikel (b und d) sind deutlich zu erkennen. In der Photographie des mikroskopischen Bildes der Myelin-Fraktion (Abb. 6) zeigt sich die typische lamellare Schichtung des Myelins, die bei einer hohen Vergrößerung (Insert Abb. 6b) noch deutlicher hervortritt. Bei den Mitochondrien (Abb. 7) sind die Cristae nur zum Teil noch erhalten, die Mehrheit der inneren Mito-

chondrienmembranen sind wahrscheinlich während der bei einem Teilschritt der Präparation vorherrschenden hypoosmotischen Umgebung verloren gegangen.

Das elektronenmikroskopische Bild der einzelnen Fraktionen zeigt im wesentlichen eine Übereinstimmung mit den erhaltenen biochemischen Daten.

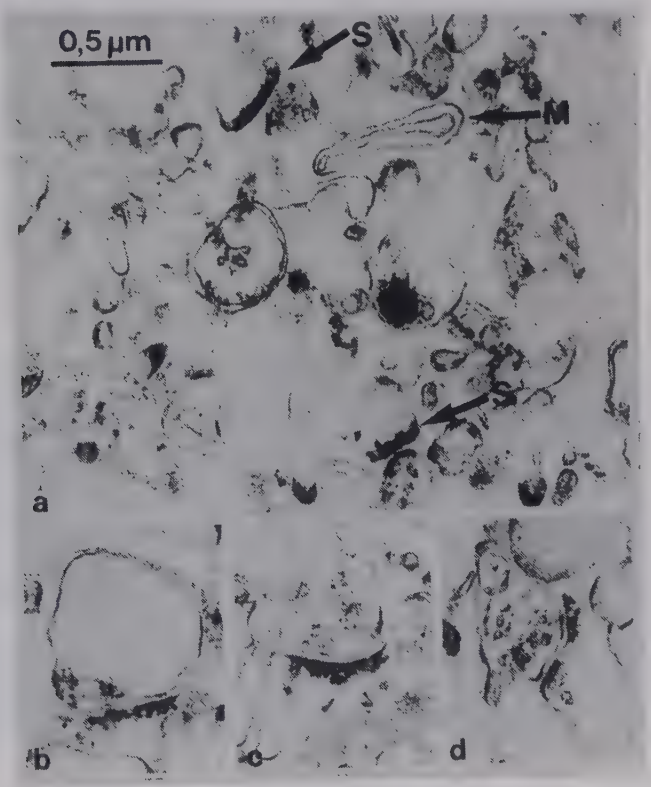


Abb. 5 Elektronenmikroskopisches Bild der synaptischen Plasmamembran-Fraktion

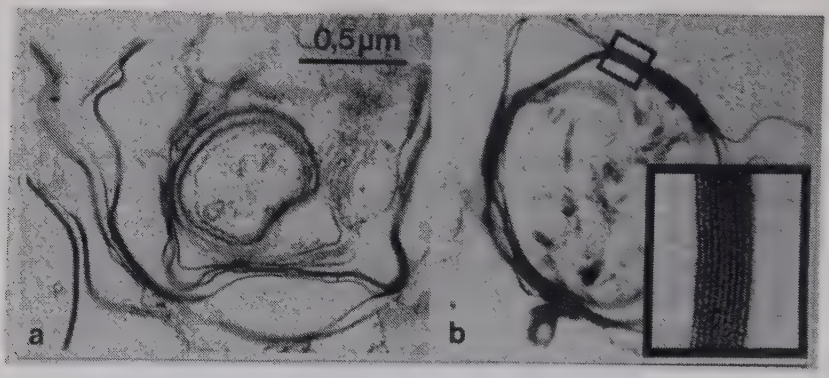


Abb. 6 Elektronenmikroskopisches Bild der Myelin-Fraktion

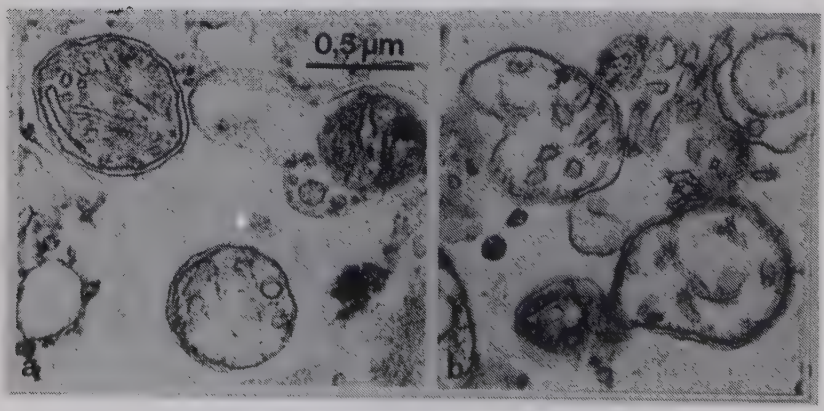


Abb. 7 Elektronenmikroskopisches Bild der Mitochondrien-Fraktion

1.3. Immunisierung der Mäuse

Die Immunisierung von Balb/c-Mäusen erfolgte durch wiederholte intraperitoneale Applikation eines Aliquots der synaptischen Plasmamembran-Fraktion . Pro Maus wurden für die erste Injektion je 100 µg SPM-Protein in komplettem, für die zweite Injektion zehn Tage später in inkomplettem Freund's Adjuvans appliziert. Die Tiere wurden nach acht und elf Wochen mit der gleichen Menge SPM in PBS geboosted und die Milz einer Maus vier Tage nach der letzten Injektion mit Myeloma-Zellen fusioniert. Kurz vor dem Töten wurde über den Plexus retroorbitalis Blut der zur Fusion bestimmten Maus gewonnen. Das daraus resultierende Serum wurde bei den Tests auf Antikörperproduktion durch die Hybridoma-Zellen als positive Kontrolle eingesetzt. Da die zur Fusion benutzten Myeloma-Zellen ihre Herkunft im Balb/c-Stamm begründen, wurden Mäuse des gleichen Stammes für die Herstellung der Zellhybride eingesetzt. Diese Maßnahme erleichterte die spätere Produktion Antikörper-enthaltender Ascites-Flüssigkeit (keine Aufzucht von F1 Mäuse-Hybriden).

1.4. Zellfusion und Selektion der Zellhybride

Die Milz einer immunisierten Maus wurde 4 Tage nach der letzten Injektion entnommen und zur Vereinzelung der Zellen durch ein Sieb geeigneter Maschengröße gestrichen. Nach dem Absetzen noch vorhandener Zellaggregate (10 Min., 4°C) wurde die Einzelzellsuspension mit serumfreien RPMI-Medium gewaschen (2 mal) und die Zellzahl bestimmt. Die gesamten Milzlymphozyten (5×10^7) wurden mit 1×10^7 P3X63Ag8.563 Maus-Myeloma-Zellen zusammengebracht und abzentrifugiert 1000 rpm, 10 Min.). Das Zellpellet wurde aufgeschüttelt. Durch tropfenweise Addition von 0,7 ml Polyäthylenglykoll (50 % in PBS) und damit einhergehendem Schütteln der Zellen erfolgte die Fusion der Zellmembranen. Das Polyäthylenglykoll wurde mit vollständigem Kulturmedium verdünnt und die Zellen auf 96 mit intraperitonealen Makrophagen vorkonditionierte Vertiefungen von Costar^{24}-Kulturplatten verteilt.

Am darauffolgenden Tag wurde zur Selektion der gewünschten Zellhybride Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (Endkonzentrationen in vollständigem RPMI-Medium: 10^{-4}, 4×10^{-7} bzw. $1{,}6 \times 10^{-5}$M) zu den Kulturen addiert. Proliferation von Zellen konnte etwa eine Woche nach der Fusion beobachtet werden. Nach etwa drei Wochen konnte das Kulturmedium von Kolonien in 80 Vertiefungen auf sekretierte Antikörper getestet werden. Als Testsystem diente der von Engvall und Perlmann (1971) beschriebene Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Als Antigen wurden synaptische Plasmamembranen (10 ug/ml PBS) eingesetzt, deren Bindung an die PVC-Platte durch eine positive Reaktion mit Antikörpern im Immunserum der fusionierten Maus indiziert wurde. Das Kontrollserum einer nicht immunisierten Maus zeigte hingegen keinen Farbumschlag in diesem Test.

In zwei der 80 getesteten Kolonien wurden Antikörper gegen die synaptische Plasmamembran-Fraktion entdeckt. Aufgrund der im folgenden beschriebenen Charakterisierung wurden die Antikörper mGalC I und mGalC II benannt. Eine unspezifische Reaktion mit Plastik oder Albumin lag nicht vor. Die Zellen wurden zweimal nach der Methode der "limiting dilution" kloniert. Die Reinheit der Klone wurde in direkter Immunfluoreszenz mit markiertem Rd-RAM-Immunoglobulin überprüft: 98 % der Zellen beider Klone zeigten Antikörperproduktion. Diese Klone wurden zur Herstellung von Ascites-Tumoren in Balb/c-Mäusen eingesetzt.

2. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

2.1. Bestimmung der Immunglobulin-Klassen

Die Bestimmung der Immunglobulin-Klassen der beiden an Antigene in der SPM-Fraktion bindenden monoklonalen Antikörper erfolgte in einem ELISA unter Anwendung klassenspezifischer Phosphatase-gekoppelter Anti-Maus-Immunglobuline. Von den eingesetzten Antikörpern gegen Maus-Immunglobuline der Unterklassen IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3 konnte für beide Klone nur mit den gegen IgG3 gerichteten eine Reaktion erhalten werden; bei beiden Antikörpern handelte es sich demnach um Immunglobuline der Klasse IgG3.

2.2. Bindung der monoklonalen Antikörper an Zellen im zentralen und peripheren Nerven-System - Untersuchungen in indirekter Immunfluoreszenz

A. Zelltyp-Spezifität der monoklonalen Antikörper im ZNS

Die Verteilung der von den monoklonalen Antikörpern gebundenen Antigene über ganze Zellen wurde unter Anwendung der indirekten Membranimmunfluoreszenz-Methode *in vitro* untersucht.

Wegen des Vorhandenseins aller wichtigen neuralen Zellen des ZNS wurden zur Untersuchung der Zellspezifität der monoklonalen Antikörper Primärkulturen aus dem Cerebellum der Ratte herangezogen. Vier bis sechs Tage alte Kulturen aus 5 - 7 Tage alten Ratten-Cerebelli enthalten neben Neuronen auch Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen, vereinzelt kommen auch Fibroblasten und Leptomeninges-Zellen vor.

In dem genannten Kultursystem reagierten mGalC I und mGalC II mit Membranen jener Gruppe von Zellen die eine Oligodendrozyten gleichende Morphologie zeigten (Abb. 8). Diese Spezifität wurde im gleichen und anderen Kultursystemen durch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen bestätigt: Zellen, die eine Färbung mit dem Neuronen-spezifischen Tetanustoxin (Mirsky, R. et al., 1978) oder dem monoklonalen, an ZNS-Neuronen bindenden

Antikörper A4 (Cohen, J. and S. Y. Selvendran, 1981) zeigten, und Zellen, deren intrazelluläres Astrozyten-spezifisches "Glial-Fibrillary-Acidic-Protein" (GFAP) (Bignami, A. et al., 1972) mit Kaninchen-Anti-GFAP-Serum angefärbt werden konnte, reagierten mit keinem der beiden monoklonalen Antikörper (Abb. 9 und Abb. 10). Zellen hingegen, die mit Kaninchen-Antiserum gegen das Oligodendrozyten-spezifische Sphingolipid Galaktocerebrosid (Raff, M. et al., 1978) (GalC) angefärbt werden konnten, hatten auch mGalC an ihre Zelloberfläche gebunden (Abb. 11). Große zytoplasmareiche Zellen ohne Fortsätze, die aufgrund dieser Morphologie und der Tatsache, daß sie mit keinem der genannten zellspezifischen Antikörper reagierten, in die Gruppe der Leptomeninges-Zellen und Fibroblasten eingeordnet wurden, zeigten keine Bindung der monoklonalen Antikörper. Bei Anwendung der monoklonalen Antikörper für intrazelluläre, indirekte Immunfluoreszenz konnte keine Färbung beobachtet werden. Gleiche Ergebnisse wurden in Kultursystemen aus verschiedenen Teilen des zentralen Nervensystems erzielt: In 10 - 14 Tage alten Kulturen aus Ratten-Hippocampus, Cerebralem Cortex, Bulbus Olfactorius und optischem Nerv reagierten die monoklonalen Antikörper nur mit der gleichzeitig mit Kaninchenserum gegen Galaktocerebrosid (rGalC) angefärbten Oligodendrozyten-Population. Keine Bindung von mGalC erfolgte an durch spezifische Antikörper identifizierte Neuronen und Astrogliazellen oder an Fibroblasten und Leptomeninges-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen die zelluläre Spezifität der monoklonalen mGalC-Antikörper im ZNS : Beide Antikörper binden spezifisch an die Membranen der Oligodendrozyten.

Abb. 8 Morphologie der mit mGalC I und mGalC II gefärbten Zellpopulation im ZNS
Cerebellum-Kulturen aus 5 Tage alten Ratten wurden nach 5 Tagen *in vitro* mit unverdünntem mGalC I-Überstand, danach mit Rd-GAM-Ig (Nordic, 1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Nur Zellen mit der Morphologie von Oligodendrozyten wurden angefärbt (a. mGalC I, b. Phasenkontrast; Skalenstrich 10 µm).

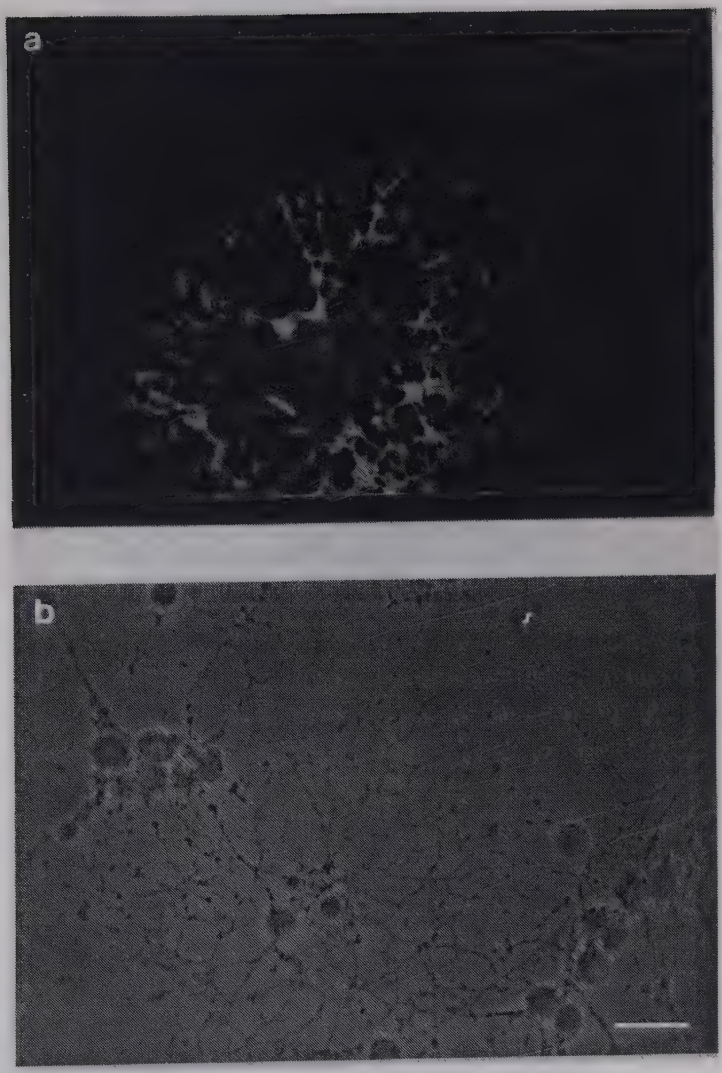

a
b

Abb. 9 Doppelfärbung von mGalC mit dem für ZNS-Neuronen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen A4
Cerebellum-Kulturen aus 5 Tage alten Ratten wurden nach 5 Tagen in vitro zuerst mit A4 (Ascites 1:100) und Fl-GAM-IgM (Nordic, 1:50), danach mit mGalC I (Ascites 1:1000) und Rd-GAM-IgG3 inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Die mit A4 markierten neuronalen Fortsätze (a) sind deutlich von den mit mGalC I gefärbten Oligodendrozyten-Membranen (b) zu unterscheiden. (c) Phasenkontrast. (Skalenstrich 10 µm)

a
b
c

Abb. 10 Doppelfärbung von mGalC mit Kaninchen-Serum gegen das Astrozyten-spezifische GFAP
Cerebrum-Kulturen aus 2 Tage alten Ratten wurden nach 10 Tagen in vitro mit mGalC I (Ascites, 1:1000) und Fl-GAM-Ig (Nordic, 1:50) inkubiert, mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert und anschließend mit rGFAP (1:50) und Rd-GAR-IgG (Nordic,1:50) gefärbt.Oligodendrozyten (grün) sind deutlich von Astrozyten (rot) zu unterscheiden.
(a. mGalC/GFAP b.Phasenkontrast; Skalenstrich 10 µm)

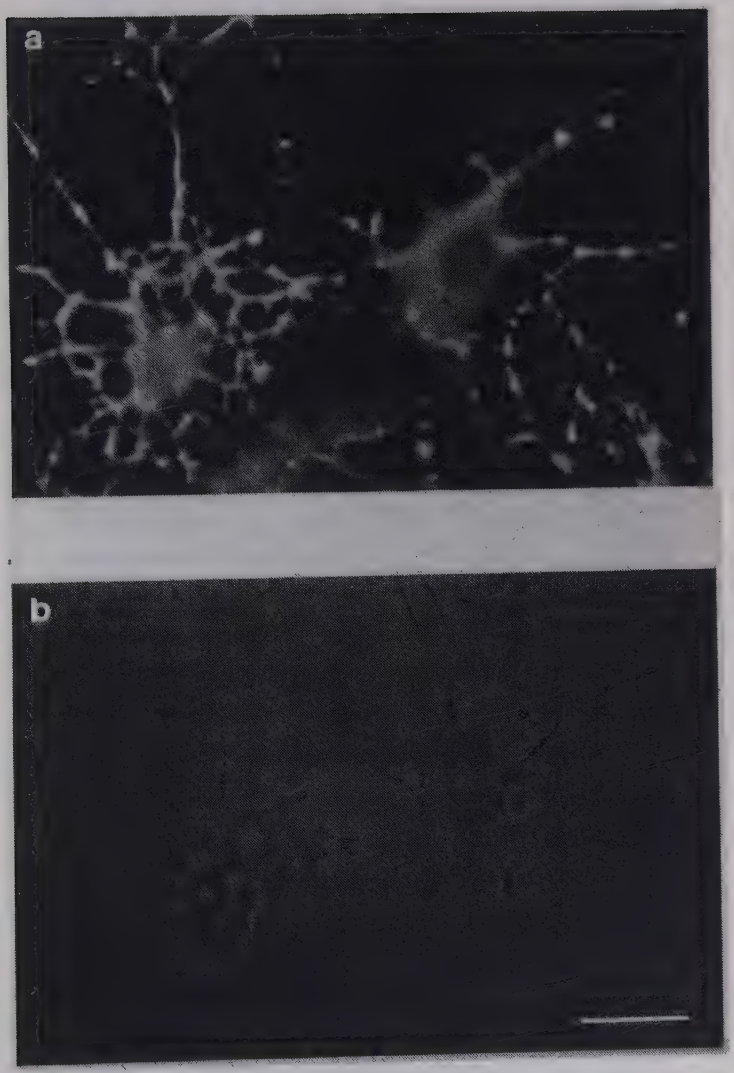
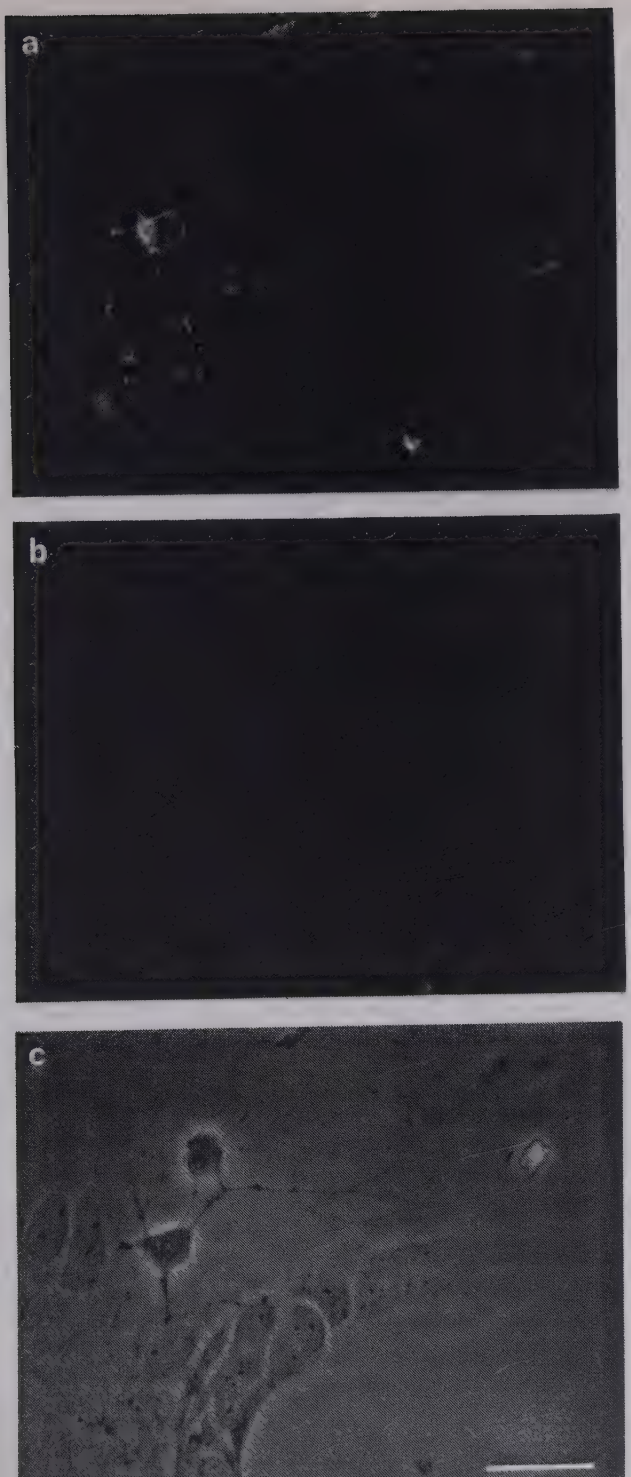

a
b

Abb. 11 Doppelfärbung von mGalC mit dem für Oligodendrozyten spezifischen rGalC
Cerebrum-Kulturen von 2 Tage alten Ratten wurden nach 10 Tagen in vitro sequentiell mit rGalC (1:30), Rd-GAR-IgG(Nordic,1:50), mGalC I(Ascites, 1:1000) und Fl-GAM-Ig (Nordic, 1:50) inkubiert und anschließend mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Das Färbemuster stimmt bis in kleine Details überein. (a. mGalC, b.rGalC, c. Phasenkontrast; Skalenstrich 10 µm)


a
b
c

B. Zelltyp-Spezifität der monoklonalen Antikörper im peripheren Nervensystem

Die Bindung der monoklonalen Antikörper an Membranen der an der peripheren Myelinisierung beteiligten Schwann-Zellen wurden mit der indirekten Fluoreszenzmethode für Membranen an Kulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten untersucht. Diese neuronenfreie Präparation enthält neben Schwann-Zellen nur Fibroblasten (Brockes, J. et al., 1977). In diesem Kultursystem waren nach 48 Stunden in vitro nur spindelförmige, von ihrer Morphologie her als Schwann-Zellen zu identifizierende Zellen mit den monoklonalen mGalC-Antikörpern angefärbt (Abb. 12). Diese Beobachtung konnte durch Doppelimmunfluoreszenzstudien bestätigt werden. Schwann-Zellen, die das im peripheren Nervensystem für eine Schwann-Zell-Population spezifische Kaninchen-Antiserum rGalC an ihre Oberfläche gebunden hatten, zeigten auch Bindung der mGalC-Antikörper (Abb. 13). In dem benutzten Kultursystem ist das Kaninchen-Antiserum gegen Thy1.1 spezifisch für Fibroblasten-Membranen (Brockes et al., 1977). In Übereinstimmung mit diesem Befund zeigten Zellen mit der Thy1.1-Markierung keine Reaktion mit den mGalC-Antikörpern (Abb. 14) und indizierten somit die Spezifität der monoklonalen Antikörper für Schwann-Zellen.

Die Frage, ob die gesamte Schwann-Zell-Population der Kultur mit den mGalC-Antikörpern reagiert, wurde durch Doppelfärbungen der Zelloberflächen mit je einem der monoklonalen Antikörper und dem für Schwann-Zellen spezifischen Maus-Antiserum RAN 1 untersucht (Fields, K. et al., 1978). In diesem Experiment wurden die Kulturen zunächst mit dem Maus-Antiserum RAN 1 (1:100) und Rd-GAM-Ig (Nordic, 1:50) danach mit je einem der mGalC-Antikörper (Kulturüberstände 1:50) und Fl-GAM-Ig (Nordic, 1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. In dieser Reihenfolge wurde mit den verwendeten Fluorochrom-Konjugaten in einer Kontrollkultur, in der RAN 1, Rd-GAM-Ig und Fl-GAM-IgG nacheinander aufgetragen

wurden, keine Bindung des Fluorescein-Konjugates beobachtet. Diese Beobachtung indiziert, daß die Bindung der Fluoresceingekoppelten Anti-Maus-Immunoglobuline unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nur in Gegenwart der monoklonalen mGalC-Antikörper erfolgt. Bindung der monoklonalen Antikörper wurde in 24 Stunden alten Ischias-Nerv-Kulturen aus neugeborenen Ratten an etwa 90-95 % der mit RAN 1 reagierenden Zellen beobachtet. Der gleiche Prozentsatz RAN 1-positiver Zellen wurde in Parallelkulturen mit Kaninchenserum gegen Galaktocerebrosid (1:30) gefärbt; mGalC und rGalC markierte Zellen waren identisch (Färbung einer Parallelkultur). In keinem Fall hatten RAN 1 negative Zellen mGalC- oder rGalC-Antikörper gebunden.

Neuere Ergebnisse indizieren Unterschiede in der Zusammensetzung der Oberflächen-Antigene auf peripheren und zentralen Neuronen (Cohen, J. and S.Y. Selvendran, 1981; Vulliamy, T. et al., 1981). Die Möglichkeit, daß ein gemeinsames, von Schwann-Zellen und peripheren Neuronen exprimiertes Antigen von den monoklonalen Antikörpern erkannt wurde, war nicht auszuschließen. Einzelzellkulturen aus Hinterwurzel-Ganglien von 5 Tage alten Ratten (Fields, K. et al., 1978), die neben Schwann-Zellen und Fibroblasten eine größere Population peripherer Neuronen enthalten, wurden zur Beantwortung dieser Frage angelegt. In Doppel-Immunofluoreszenz-Studien, in denen der monoklonale Antikörper 38/D7 (1:50) (Vulliamy, T. et al., 1981), gefolgt von Rd-GAM-IgM (Nordic, 1:50), zur Identifizierung der Neuronen benutzt wurde, reagierten in der gleichen Kultur die danach applizierten mit Fl-GAM-IgG3 (Nordic, 1:50) markierten mGalC-Antikörper(Kulturüberstände 1:50) nur mit Zellen, die 38/D7 nicht gebunden hatten. Durch ihre Spindelform sowie durch die gleichzeitige Bindung von Kaninchen-Antiserum gegen GalC und monoklonalen mGalC-Antikörpern in Parallelkulturen wurden diese Zellen als Schwann-Zellen identifiziert.

In keinem der beiden Kultursysteme aus dem peripheren Nervensystem reagieren die monoklonalen Antikörper mit intrazellulären Antigenen. Doppelfärbungen von mGalC I und mGalC II mit anderen zellspezifischen Antikörpern zeigen absolute Identität.

Abb. 12 Morphologie der mGalC-bindenden Zellen im peripheren Nervensystem
Primärkulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten wurden nach 48 Stunden in vitro mit mGalC I (Ascites, 1:1000) und Rd-GAM-IgG3 (Nordic, 1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Nur spindelförmige Schwann-Zellen haben die mGalC-Antikörper an ihre Membranen gebunden, die Fibroblasten bleiben ungefärbt. (a. mGalC I; b. Phasen-Kontrast; Skalenstrich 10 µm)

Abb. 13 Doppelfärbung eines mGalC-Antikörpers mit Kaninchenantiserum gegen Galaktocerebrosid
Kulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten wurden nach 24 Stunden *in vitro* mit rGalC (1:30), Fl-GAR-IgG (Nordic, 1:50), mGalC I (Ascites, 1:1000) und Rd-GAM-IgG3 (Nordic, 1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (96:5) fixiert. Identische Zellen werden angefärbt.
(a. mGalC I, b. rGaLC, c. Phasenkontrast; Skalenstrich 10 µm)

Abb. 14 Doppelfärbung eines mGalC-Antikörpers mit Kaninchen-Antiserum gegen Thy 1.1
Kulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten wurden nach 40 Stunden in vitro nacheinander mit Thy 1.1 (1:100), Rd-GAR-IgG(Nordic,1:50), mGalC I(Kulturüberstand 1:50) und Fl-RAM-IgG (Nordic, 1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Trotz schlechter Auflösung im Phasenkontrast ist deutlich zu erkennen, daß Zellen mit unterschiedlicher Morphologie angefärbt werden.
(a. Thy 1.1, b. mGalC I, c. Phasenkontrast; Skalenstrich 10 µm)

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß beide monoklonalen Antikörper im peripheren Nervensystem spezifisch an die Oberflächen von Schwann-Zellen binden. Die Frage, warum nicht alle Schwann-Zellen der Ischias-Nerv-Kultur mit den Antikörpern reagieren, wird im Laufe dieser Arbeit noch diskutiert werden.

Die Versuche in Primärkulturen aus verschiedenen Teilen des zentralen und peripheren Nervensystems haben gezeigt, daß beide monoklonalen Antikörper spezifisch an Antigene auf der Oberfläche der an der Myelinisierung beteiligten Zellen binden.

2.3. Spezies-Spezifität

In 7 Tage alten Kulturen aus dem cerebralen Cortex von 13 Tage alten Hühner- oder 20 Tage alten Mäusefoeten reagierten die monoklonalen Antikörper - wie in den Kulturen aus dem Nervensystem der Ratte - spezifisch mit der Oligodendrozyten-Population. Zellen, die einen der monoklonalen Antikörper gebunden hatten, waren nie mit Antiserum gegen das Astrozyten-spezifische GFAP angefärbt, reagierten jedoch mit dem Oligodendrozyten-spezifischen Kaninchenserum rGalC.

Diese Experimente indizieren, daß die monoklonalen mGalC-Antikörper eine mehreren Tierspezies gemeinsame Determinante erkennen.

2.4. Antigenspezifität

Die von den monoklonalen Antikörpern erkannten Antigene halten in einer frisch dissoziierten Zellsuspension aus neugeborenem Ratten-Cortex einer 30-minütigen Trypsin-Behandlung stand. Dieser Befund beinhaltet die Möglichkeit, daß die Antigenspezifität der monoklonalen Antikörper auf Lipide gerichtet sein könnte.

Von verschiedenen Autoren sind Galaktocerebrosid und dessen sulfatierte Form, Sulfatid (Raff, M. et al., 1978; Mirsky, R. et al., 1980), als spezifisch für die an der Myelinisierung beteiligten Zellen beschrieben worden. Die Bindung der monoklonalen Antikörper an eines oder beide Lipide oder deren metabolische Vorstufen (Psychosin, Ceramid und Sphingosin) wurde in einem für Sphingolipide modifizierten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht.

A. Modifizierung des ELISA-Testsystems für Sphingolipide

Wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften mußten die Lipide in einem organischen Lösungsmittel gelöst und auf die Polyvinylchlorid- Mikrotiterplatten aufgetragen werden. Da das üblicherweise zur Lösung von Lipiden verwendete Chloroform/Methanol-Gemisch (Mischungsverhältnis 2:1, v/v) die Struktur der Polyvinylchlorid-Platten veränderte, mußte ein anderes Mischungsverhältnis gewählt werden, das diese Eigenschaft nicht zeigte und in dem dennoch die Löslichkeit der Lipide gewährleistet war. Diese Anforderungen erfüllte ein Chloroform/Methanol-Gemisch im Mischungsverhältnis 1:1.

In einem Vorversuch wurde das Anhaften von radioaktiv markiertem, in Chloroform/Methanol (1:1, v/v) gelöstem Galaktocerebrosid (^{3}H-Galaktocerebrosid von Dr. J. Morgan) überprüft. Nach dem Eintrocknen des Lösungsmittels wurde der ELISA-Test wie für Proteine beschrieben durchgeführt. Von der applizierten ^{3}H-Galaktocerebrosid-Gesamtmenge blieben nach allen darauffolgenden Waschvorgängen 80 % der eingesetzten Radioaktivität auf der Platte haften. Die einzusetzende Lipidkonzentration wurde mit ^{3}H-GalC als Variable ausgetestet. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml wurde bei konstant gehaltenem Volumen von 30 µl/Vertiefung die maximal mögliche Menge Galaktocerebrosid an die Polyvinylchlorid-Platten gebunden, eine Erhöhung der Konzentration führte nicht zu einer erhöhten Bindung des Lipids.

In einem weiteren Experiment wurde die Eignug des Tests für die Bindung von Antikörpern an das Lipidhapten untersucht. Es bestand durchaus die Möglichkeit, daß das organische Lösungsmittel den Hintergrund erhöht , oder daß die Lipide auf der Plastikunterlage so orientiert werden, daß die Bindung von Antikörpern an das Antigen behindert wird.

Dieser Versuch wurde mit Galaktocerebrosid als Antigen und Kaninchen-Antiserum gegen dieses Lipid (rGalC) durchgeführt: Jeweils 50 µl des in Chloroform/Methanol (1:1,v/v) in einer Konzentration von 100 µg/ml gelösten Galaktocerebrosids wurden auf einer PVC-Mikrotiterplatte angetrocknet. Nicht besetzte Bindungsstellen auf der Plastikunterlage wurden mit einer 1%igen Ovalbuminlösung (1% in PBS) abgesättigt (60 Min., Raumtemperatur). In diesem Experiment mußte das üblicherweise verwendete Rinder-Serumalbumin durch Ovalbumin substituiert werden, da die Immunisierung des Kaninchens mit dem Lipidhapten in Gegenwart von Rinder-Serumalbumin erfolgt war. Das gewonnene Antiserum enthält daher Antikörper gegen dieses Protein. Nach dem Absättigen der Bindungsstellen wurde der ELISA-Test wie für Proteine beschrieben durchgeführt. Das verwendete Kaninchen-Serum rGalC wurde in einer Serienverdünnung, beginnend bei einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt, das Phosphatase-gekoppelte Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen IgG wurde in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Für die Verdünnungen der Antikörper wurde eine 1%ige Ovalbuminlösung (in PBS) verwendet.
In diesem Test wurde der Titer des Kaninchen-Antiserums für Galaktocerebrosid bestimmt : Er betrug 1:1280. Kontrollen ohne das Lipidantigen (nur Chloroform/Methanol 1:1,v/v) und Kontrollen, in denen die unspezifische Bindung des Phophatase-gekoppelten zweiten Antikörpers an Plastik oder Antigen getestet wurde, zeigten keine Umsetzung des Enzymsubstrats.

Die hier beschriebenen Beobachtungen indizieren die Eignung des neu entwickelten Tests für Spezifitäts- und Titerbestimmungen von Antikörpern gegen Sphingolipide.

B. Spezifität der monoklonalen Antikörper für Sphingolipide

Die Spezifität der monoklonalen mGalC-Antikörper für Sphingolipide wurde in dem zuvor beschriebenen, modifizierten ELISA untersucht. In den Experimenten mit den monoklonalen Maus-Antikörpern wurde anstelle des nur im speziellen Fall des Kaninchen-Antiserums gegen Galaktocerebrosid verwendeten Ovalbumins wieder das für ELISA-Tests übliche Rinder-Serumalbumin benutzt. Bei den Enzym-gekoppelten Antikörpern handelte es sich um Ziegen-Antikörper, die gegen Maus-Immunglobuline der Unterklasse IgG3 gerichtet waren. Diese Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 verwendet.
Verschiedene Sphingolipide (Sphingosin, Psychosin, Ceramid, Galaktocerebrosid, Sulfatid und eine Gangliosidmischung) wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml Lipid in Chloroform/Methanol im Mischungsverhältnis 1:1 gelöst. Bei einigen Lipiden verbesserte eine zusätzliche Ultraschallbehandlung das Löseverhalten in den organischen Lösungsmitteln. Die Lipide wurden wie zuvor in einer Konzentration von 5 µg/Loch verwendet.
In Tabelle 4 sind die Titer der mGalC-Antikörper für die genannten Sphingolipide tabellarisch zusammengefaßt.

Tabelle 4 Spezifität der mGalC-Antikörper für Sphingolipide

	mGalC I	mGalC II
Sphingosin	-	-
Ceramid	-	-
Psychosin	1 : 512	1 : 512
Galaktocerebrosid	1 : 512	1 : 512
Glukocerebrosid	-	-
Sulfatid	1 : 16	1 : 16
Ganglioside	-	-

Angegeben sind die Titer von mGalC-Kulturüberständen.
'-' bedeutet, daß keine Reaktion beobachtet wurde.

In dem hier durchgeführten Test zeigen beide monoklonalen mGalC-Antikörper identische Titer für die gleichen Lipide: Beide Antikörper reagieren ausschließlich mit den Galaktosphingolipiden Galaktocerebrosid, Psychosin und in geringerem Maße mit Sulfatid. Zuckerfreie Sphingolipide (Sphingosin (eine Fettsäure) und Ceramid (zwei Fettsäuren)) oder Glukocerebrosid, bei dem die Galaktose durch Glukose substituiert ist, werden nicht erkannt. Die sich nur durch die Zahl ihrer Fettsäuren unterscheidenden Galaktosphingolipide Galaktocerebrosid (Galaktose mit zwei Fettsäuren) und Psychosin (Galaktose mit einem Fettsäurerest) werden mit gleichem Titer gebunden. Die Reaktion mit Sulfatid (bei diesem Molekül trägt die Galaktose des Galaktocerebrosids in der Position 3 eine Sulfatgruppe) ist um den Faktor 16 geringer als die Reaktivität mit Galaktocerebrosid und Psychosin. Eine Bindung der Antikörper an Ganglioside wurde nicht beobachtet. Dieses Ergebis demonstriert die Spezifität der monoklonalen mGalC-Antikörper : Beide Antikörper erkennen gleichermaßen eine Determinante, die aus Galaktose und einem aliphatischen Fettsäurerest besteht. Die negativ geladene sulfatierte Galaktose verringert die Bindung der Antikörper um den Faktor 16.

Die Möglichkeit , daß eine oder mehrere Kontaminanten in den verwendeten Lipidpräparationen das Ergebnis beeinflußt haben könnten, wurde in einem weiterführenden Experiment untersucht.
Alle verwendeten Lipide wurden einer sorgfältigen Analyse durch Dünnschichtchromatographie unterworfen . Bei der ersten qualitativen Analyse mit einem Schwefelsäure/Wasser-Gemisch (1:1) als Reagenz zeigten,bis auf das synthetisierte N-Lignoceryl-DL-Dihydrogalaktocerebrosid, alle anderen Lipide auf dem Chromatogramm mehrere Banden.
Die Bindung der monoklonalen Antikörper an die Lipidbanden auf dem Chromatogramm wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Um das für das Sichtbarmachen der Lipide erforderliche Erhitzen der Chromatographieplatten auf 180°C nach dem Besprühen mit dem Schwefelsäure/Wassergemisch wegen möglicher Änderungen der Lipide zu umgehen, wurde für dieses Experiment

Primulin als Reagenz für das Entwickeln der Chromatogramme verwendet. Um den direkten Kontakt der Lipide durch das verwendete Sprühreagenz zu vermeiden, wurden die für den Antikörperbindungstest einzusetzenden Lipidlaufflächen mit Pappstreifen vor dem Reagenz geschützt. Die zwischen zwei markierten Banden des gleichen Lipids liegenden nicht besprühten , unmarkierten Lipidbanden wurden ausgekratzt, in Chloroform/Methanol (1:1,v/v) extrahiert und nach dem Entfernen des Silicagels durch Zentrifugieren als Antigene im ELISA für Sphingolipide eingesetzt. Da sich die monoklonalen mGalC-Antikörper in allen bisher durchgeführten Untersuchungen als absolut identisch erwiesen hatten, wurde die Analyse mit den gereinigten Lipiden nur mit einem der Antikörper, mGalC I, durchgeführt.
In Tabelle 5 sind die Rf-Werte der mit mGalC I reagierenden Lipidbanden und die dazugehörigen Titer im ELISA dargestellt.

Tabelle 5 Bindung von mGalC I an gereinigte Sphingolipide im ELISA

	Rf-Wert	Titer
Galaktocerebrosid (N-Lignoceryl-DL-Dihydrogalaktocerbrosid)	0,648	1 : 1024
Galaktocerebrosid (aus Rinderhirn)		
oberer Fleck	0,593	1 : 1024
unterer Fleck	0,539	1 : 1024
Psychosin (aus Rinderhirn)	0,067	1 : 1024
Sulfatid (aus Rinderhirn)	0,376	1 : 128

Mit anderen als den hier aufgeführten gereinigten Lipiden konnte keine Reaktion festgestellt werden.

Die Bindung des monoklonalen Antikörpers erfolgt jeweils nur an das prinzipielle, durch einen typischen Rf-Wert charakterisierbare Lipid der Mischung. Bei dem aus Rinderhirn isolierten Galaktocerebrosid wird eine Reaktion mit dem oberen und unteren Fleck des Chromatogramms beobachtet. Die verschiedenen Rf-Werte sind in der unterschiedlichen Komposition der Fettsäuren in diesem Molekül begründet. Da der Fettsäureteil an der Bindung der monoklonalen Antikörper nur in geringem Ausmaß beteiligt zu sein scheint , ist eine Reaktion mit Galaktocerebrosiden verschiedener Fettsäurekomposition durchaus zu erwarten. Der monoklonale Antikörper mGalC reagiert auch mit synthetisiertem N-Lignoceryl-DL-Dihydrogalaktocerebrosid - der Unterschied zu dem aus Rinderhirn isolierten GalC liegt wieder in der Komposition der Fettsäuren. Psychosin wird wie zuvor mit gleichem Titer wie GalC gebunden, die Reaktion mit Sulfatid ist um den Faktor 8 geringer. Dieser Unterschied zu der zuvor gemachten Beobachtung, daß die Reaktivität mit Sulfatid um den Faktor 16 geringer ist als die mit Psychosin und GalC, liegt in den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen begründet: Der mGalC-Antikörper wurde in dem hier durchgeführten Experiment nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 1024 titriert, sodaß der genaue Titerendpunkt nicht erfaßt werden konnte. Für die Feststellung, ob mGalC mit Kontaminanten in den Lipidpräparationen reagiert, war die Kenntnis des absoluten Titerendpunktes nicht relevant. Der insgesamt höhere Titer des mGalC-Antikörpers für die getesteten Galaktosphingolipide liegt an der Verwendung einer anderen Charge des mGalC-haltigen Hybridoma-Kulturüberstands. Das hier dargestellte Experiment zeigt, daß mGalC spezifisch mit den Galaktosphingolipiden und nicht mit Kontaminanten in den Lipidpräparationen reagiert.

C. Adsorption der mGalC-Antikörper an Sphingolipid-enthaltende Mizellen

Zur Bestätigung der Antigenspezifität wurde einer der monoklonalen Antikörper, mGalC I, an Sphingolipid enthaltende Cholesterol/Lecithin-Mizellen adsorbiert und das Verschwin-

den der Antikörperaktivität aus dem Kulturmedium durch indirekte Immunfluoreszenz an Oligodendrozyten in 14 Tage alten Kulturen aus dem Cerebrum neugeborener Ratten getestet. Die Adsorption des Antikörpers an die Mizellen erfolgte aus 1:5 verdünntem, antikörperhaltigem Hybridoma-Kulturüberstand zunächst für 2 Stunden bei 37°C, danach über Nacht bei 4°C. Nach dem Abzentrifugieren der Lipidpartikel wurden die verbliebenen Überstände ohne weitere Verdünnung in indirekter Immunfluoreszenz an kultivierten Oligodendrozyten aus dem Cortex neugeborener Ratten getestet.
Die Fluoreszenzintensität an Oligodendrozytenmembranen war bei den zuvor an Sphingosin, Ceramid, Gangliosid und Glukocerebrosid enthaltende Mizellen adsorbierten Kulturüberständen mit der Kontrolle (Adsorption der Kulturüberstände an Cholesterol/Lecithin-Mizellen ohne inkorporiertes Sphingolipid) vergleichbar. Nach der Adsorption an GalC- und Psychosin-enthaltende Mizellen war die Antikörperaktivität ganz aus dem Kulturmedium verschwunden, nach der Adsorption mit Sulfatid-haltigen Mizellen lag die Fluoreszenzintensität innerhalb des Variationsbereiches der Kontrollen.
Diese Beobachtungen bestätigen die im ELISA bestimmte Spezifität von mGalC für die Galaktosphingolipide GalC und Psychosin. Da Psychosin nicht in Oligodendrozytenmembranen vorzukommen scheint, wird bei der Bindung des mGalC-Antikörpers an diese Zellen bei entsprechend hoher Verdünnung vermutlich nur Galaktocerebrosid gebunden.

3. Untersuchungen zur Entwicklung von Oligodendozyten und Schwann-Zellen unter Anwendung der mGalC-Antikörper

Ziel dieser Versuche war die Untersuchung der Frage, ob die Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid in differenzierenden Oligodendrozyten und Schwann-Zellen zum gleichen Zeitpunkt der Entwicklung ausgeprägt werden,oder ob die Expression eines der beiden Lipide mit einer zeitlichen Verzögerung gegenüber dem anderen auftritt. Die genannte Frage wurde mit Hilfe der mGalC-Antikörper und Kaninchen-Antiseren gegen Sul-

fatid bearbeitet. Die genannten Antikörper wurden nach sorgfältiger Charakterisierung in indirekter Immunfluoreszenz an sich entwickelnden Oligodendrozyten und Schwann-Zellen eingesetzt. Wegen der identischen Reaktionen der mGalC-Antikörper in allen bisher durchgeführten Charakterisierungsexperimenten wurde es als ausreichend angesehen,nur mit einem der beiden Antikörper, mGalC I, zu arbeiten. mGalC II wurde bei einigen kritischen Experimenten zur Überprüfung der Übereinstimmung der mit mGalC I gemachten Beobachtungen herangezogen.

3.1. Charakterisierung von Kaninchen-Antiseren gegen GalC und Sulfatid

Kaninchen-Antiseren gegen GalC und Sulfatid (aus den Laboratorien von Prof.S.Liebowitz und Prof.M.Raff) wurden auf ihre Spezifität und Kreuzreaktivität mit den entsprechenden Lipidantigenen untersucht. Als Testsystem diente der zuvor beschriebene ELISA für Sphingolipide.
In Tabelle 6 sind die Reaktivitäten von drei Kaninchen-Antiseren mit verschiedenen Sphingolipiden dargestellt. Als Vergleich wurden die Titer der für die Entwicklungsstudien verwendeten mGalC I-Ascites-Flüssigkeit mit in die Tabelle aufgenommen.
Die in Tabelle 6 dargestellten Reaktivitäten zeigen, daß das Kaninchen-Antiserum rGalC hauptsächlich an GalC bindet (Titer 1:1280) und nur wenig mit Psychosin und Sulfatid kreuzreagiert (Titer jeweils 1:40). Die Kaninchen-Antiseren rSulf 1 und 2 zeigen einen 16-fach höheren Titer für Sulfatid (Titer 1:1280) als für Psychosin oder GalC (Titer jeweils 1:80). Bei rSulf 1 handelt es sich um ein heteroklitisches Antiserum, welches nach der Immunisierung eines Kaninchens mit synthetischem Galaktocerebrosid erhalten wurde. Die zum Vergleich eingesetzte mGalC-Ascitesflüssigkeit zeigt gegenüber den Kaninchen-Antiseren um etwa eine Zehnerpotenz erhöhte Titer. Diese Beobachtung demonstriert einen der Unterschiede bei der konventionellen und der monoklonalen Antikörperproduktion.

Tabelle 6 Reaktivitäten verschiedener Kaninchen-Antiseren und mGalC I (Ascitesflüssigkeit) mit Sphingolipiden im ELISA

Antikörper	Immunogen	Reaktivität mit verschiedenen Lipiden		
		Psychosin	Galakto-cerebrosid	Sulfatid
Kaninchen Antiserum I (rGalC)	N-Lignoceroyl-Dihydro-GalC	1:40	1:1280	1:40
Kaninchen Antiserum II (rSulf 1)	N-Lignoceroyl-Dihydro-GalC	1:80	1:80	1:1280
Kaninchen Antiserum III (rSulf 2)	Sulphatid	1:80	1:80	1:1280
Monoklonaler Maus-Antikörper (Ascites) (mGalC)	synaptische Plasma-Membranen	1:10240	1:10240	1:640

Es sind jeweils die Titer-Endpunkte angegeben. Mit keinem der getesteten Antikörper wurde eine Bindung an Sphingosin, Ceramid, Glukocerebrosid oder Ganglioside beobachtet.

3.2. Blockierungs- und Kompetitionsexperimente mit Kaninchen-Antiserum gegen Sulfatid und monoklonalem mGalC-Antikörper

Zur Untersuchung der Frage, ob mGalC und rSulf selektiv zur Markierung des Galaktocerebrosids und des Sulfatids auf den Membranen der Myelin-bildenden Zellen eingesetzt werden können, wurde in Blockierungs- und Kompetitionsexperimenten die Konkurrenz der beiden Antikörper um die gleiche Bindungsstelle untersucht.
Die Experimente wurden folgendermaßen durchgeführt :
Die Galaktocerebrosid- bzw. Sulfatidbindungsstellen auf Oligodendrozytenmembranen in 10 Tage alten Kulturen aus dem Cortex neugeborener Ratten wurden durch Inkubation mit mGalC (Ascitesflüssigkeit, Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:50) bzw. mit rSulf (Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:50) besetzt (60 Min. bei Raumtemparatur). Nach dieser Zeit wurde das Inkubationsmedium erneuert : Neben mGalC bzw. rSulf in den genannten Verdünnungen enthielt es jetzt gleichzeitig die Antikörper mit der Spezifität für die hypothetisch noch freien Glykolipide. Zusammen mit mGalC in den verschiedenen Verdünnungen wurde jetzt also gleichzeitig rSulf (Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:50), und zusammen mit rSulf in den entsprechenden Verdünnungen wurde auch mGalC (Verdünnungen 1:1, 1:10 und 1:50) appliziert. Jeder Antikörper wurde in jeder der genannten Verdünnungen mit dem anderen in den verschiedenen Verdünnungen kombiniert. Nach 60 Min. Inkubationszeit wurde die Bindung der Antikörper an die beiden Galaktosphingolipide durch Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit den entsprechenden speziesspezifischen voradsorbierten Fluorochromkonjugaten (Fl-GAM-IgG und Rd-GAR-IgG, gleichzeitige Applikation) sichtbar gemacht.

Unter keiner der beschriebenen Bedingungen und mit keiner der genannten Antikörperkonzentrationen konnten die GalC- oder die Sulfatidbindungsstellen auf der Zellmembran durch einen der Antikörper blockiert und so für den anderen unzugänglich gemacht werden : Die Oligodendrozyten hatten beide Antikörper gebunden.

Unter veränderten Versuchsbedingungen, bei gleichzeitiger Applikation der rSulf- und mGalC-Antikörper (Verdünnung 1:1, 1:10, 1:50, 1:100; alle Verdünnungen des einen Antikörpers wurden mit allen Verdünnungen des anderen kombiniert) für 60 Min. und anschließender Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe mit den entsprechenden Fluorochromkonjugaten wurde - zumindest bei den hohen Verdünnungen - die gleiche Beobachtung gemacht : Mit 1:50 und 1:100 verdünnter mGalC-enthaltender Ascitesflüssigkeit konnte die Bindung der rSulf-Antikörper nicht beeinflußt werden. Bei der Erhöhung der Konzentration der mGalC-Ascitesflüssigkeit auf 1:10 konnte eine geringfügige Reduktion der Fluoreszenzintensität bei der Sulfatidfärbung beobachtet werden; mit 1:1 verdünnter Ascitesflüssigkeit konnte die Bindung des rSulf-Antiserums in allen Verdünnungen vollständig durch mGalC blockiert werden. Eine Beeinflussung der Bindung des mGalC-Antikörpers durch das rSulf-Antiserum wurde unter keiner der Versuchsbedingungen beobachtet.
Das Ergebnis des zuletzt beschriebenen Experiments könnte durch die Blockierung der Sulfatidbindungsstellen auf den Zelloberflächen durch hohe Konzentration von mGalC oder durch sterische Hinderung der rSulf-Bindung erklärt werden: Entweder besetzt mGalC - wenn dieser Antikörper in sehr hohen Konzentrationen angeboten wird - durch eine im Vergleich mit rSulf höhere Bindungsaffinität die Sulfatidmoleküle (in Tabelle 6 ist die Kreuzreaktivität von mGalC mit Sulfatid ersichtlich) oder unter den gewählten Versuchsbedingungen tritt durch die hohe Konzentration an gebundenen mGalC-Antikörpern an das Galaktocerebrosid der Oligodendrozytenmembran eine sterische Hinderung der Bindung von rSulf ein. Die sterische Interferenz könnte in Zusammenhang mit der Menge des Galaktocerebrosids auf differenzierten Oligodendrozytenmenbranen stehen : 23 Prozent des Gesamtlipids der an der Myelinisierung beteiligten Zellen wird von Galaktocerebrosid eingenommen. Sulfatid macht nur vier Prozent des gesamten Myelinlipids aus (W.T. Norton and L.A.Autilio, 1966)

Diese Experimente zeigen, daß die Konzentration der Antikörper eine kritische Variable darstellt. Für die Markierung des Galaktocerebrosids auf Oligodendrozyten- und Schwann-Zellmembranen wurde zur Vermeidung der Kreuzreaktivität mit Sulfatid, mGalC in einer möglichst hohen Verdünnung eingesetzt. Für die Entwicklungsstudien wurde die mGalC-enthaltende Ascitesflüssigkeit in einer Verdünnung von 1 : 1000 verwendet. Damit liegt die Konzentration des mGalC um zwei Größenordnungen tiefer als die Interferenzschwelle mit rSulf. Weiterhin wurden zur Vermeidung jeglicher Beeinflussung der Ergebnisse durch die Bindung von mGalC an Sulfatid in allen Doppelmarkierungsexperimenten mit mGalC und rSulf die Kulturen zuerst mit rSulf und dem entsprechenden Fluorochromkonjugat inkubiert, erst nachdem alle Sulfatidbindungsstellen durch den Kaninchen-Antikörper besetzt waren, erfolgte die Applikation des monoklonalen mGalC-Antikörpers und des entsprechenden Fluorochromkonjugats.

Die besprochenen Experimente indizieren, daß mGalC und rSulf unter den in den Versuchen eingehaltenen Bedingungen trotz geringer Kreuzreaktivitäten zur Markierung jeweils eines Lipids verwendet werden können : mGalC für Galaktocerebrosid und rSulf für Sulfatid.

3.3. Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid auf den Oberflächen sich entwickelnder Oligodendrozyten in Zellsuspensionen

Die Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid auf den Zelloberflächen sich entwickelnder Oligodenrozyten wurde mit dem monoklonalen mGalC-Antikörper (mGalC I) und Kaninchen Antiserum gegen Sulfatid (rSulf 1 und rSulf2) in indirekter Immunfluoreszenz an Zellen in Suspension verfolgt. Die Markierung der Zellen mit den Antikörpern erfolgte in Zellsuspensionen aus den Cortices von Ratten in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Cortices von 15 bis 21 Tage alten Rattenembryonen und von neugeborenen , fünf und zehn Tage alten Tieren, wurden wie für Kulturen beschrieben dis-

soziiert. Die unspezifische Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Mikrogliazellen wurde durch Vorinkubation der Zellen in 50 % Ziegenserum (in MEM-Hepes mit 10 % FKS und 0,02 % NaN_3) und die Gegenwart dieses Serums bei allen Inkubationsschritten ausgeschlossen.
Das Ergebnis dieses Experiments ist in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7 Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid an Oligodendrozyten in Zellsuspensionen aus dem Rattencortex

Alter (Tage)	Galaktocerebrosid	Sulfatid
Embryonal		
15	-	-
17	-	-
19	-	-
21 (Geburt)	-	-
post partum		
1	+	-
2	+	-
5	+	+ (40 %)
10	+	+ (90 %)

'-' keine Zellen markiert, '+' Zellen markiert
Die Zahlen in Klammer geben den Prozentsatz rSulf-positiver Zellen in der GalC-positiven Zellpopulation an.

An Zellen aus Rattenembryonen verschiedenen Alters wurde in den hier durchgeführten Doppelimmunfluoreszenstudien keine Bindung von mGalC- oder rSulf-Antikörpern beobachtet. In Zellsuspensionen aus neugeborenen Tieren wurden einige wenige Zellen (8 Zellen aus 1000 gezählten) mit mGalC angefärbt,

keine dieser Zellen bindet gleichzeitig rSulf. Die Anzahl der GalC-positiven Zellen nimmt mit dem Alter der Tiere zu : In zwei Tage alten Tieren sind etwa 2% , in 5 Tage alten Tieren etwa 6 % der gesamten Zellen in der Suspension mit mGalC gefärbt. Die ersten Sulfatid-positiven Zellen entstehen zwischen dem 3 und 4 Tag nach der Geburt der Ratte. In Zellsuspensionen aus dem Cortex von fünf Tage alten Ratten sind 40 Prozent der GalC-positven Zellen gleichzeitig auch mit rSulf markiert. Dieser Prozentsatz vergrößert sich bei Suspensionen aus dem Cortex von 10 Tage alten Tieren auf 90 Prozent.
Beim Vergleich des Färbemusters von rSulf 1 und rSulf 2 wurde - wie erwartet - kein Unterschied festgestellt. In Doppelmarkierungsexperimenten mit dem Kaninchen-Antiserum gegen Galaktocerebrosid und mGalC wurden zu allen untersuchten Zeitpunkten (postnataler Tag 1, 2 und 5) alle mGalC-positiven Zellen auch mit dem Kaninchen-Antiserum angefärbt. Zu allen in diesem Experiment untersuchten Zeitpunkten wurde die Färbung mit rSulf-Antikörpern ausschließlich an GalC-positiven Zellen beobachtet.
Dieses Ergebnis indiziert, daß Sulfatid auf den Oberflächen sich entwickelnder Oligodendrozyten erst dann exprimiert wird, wenn diese Zellen schon Galaktocerebrosid in ihre Membranen eingebaut haben.

3.4. Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid auf den Oberflächen sich entwickelnder Oligodendrozyten in Kultur

In dieser Versuchsreihe wurde die Expression der Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid an Oligodendrozyten in Kulturen aus dem sich entwickelnden Ratten-Cortex untersucht. Die Cortices von 16 Tage alten Rattenembryonen oder neugeborenen Tieren wurden nach der Dissoziation auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausplattiert und über mehrere Wochen in Kultur gehalten. Die Entwicklung der Oligodendrozytenpopulation in diesen Kulturen wurde anhand von Doppelimmunfluoreszenz-Markierungen mit mGalC-Antikör-

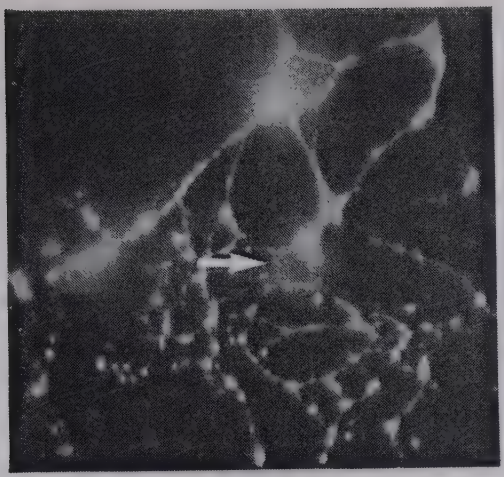
per und Kaninchen-Antiserum gegen Sulfatid verfolgt. In diesem Experiment wurden wie für die Suspensionsfärbung mGalC I und rSulf 1 und 2 verwendet.

In Kulturen aus dem Cortex neugeborener Ratten und in Kulturen aus 16 Tage alten Rattenembryonen wurden nach einem bzw. sechs Tagen in Kultur (beides entspricht dem Alter eines einen Tag alten Tieres) nur wenige GalC-positive Zellen vorgefunden. Von diesen waren 30 Prozent auch mit rSulf-Antiserum angefärbt. Die Sulfatidmarkierung war sehr schwach, häufig konnten die rSulf-markierten Zellen nur wegen der gleichzeitig leuchtenden Fluoreszenz mit dem monoklonalen mGalC identifiziert werden. Die Bindung der rSulf-Antikörper war zu diesem Entwicklungszeitpunkt häufig auf die Zellsomata beschränkt, während sich bei bei den gleichzeitig mit mGalC markierten Zellen die Färbung über die gesamte Zelle einschließlich ihrer Fortsätze erstreckte(Abb.14). Nach weiteren fünf Tagen in Kultur (entspricht dem Alter 6 Tage alter Tiere) zeigten bei zunehmender Zahl der GalC-positiven Zellen etwa 70 Prozent der GalC-positiven Oligodendrozyten gleichzeitig auch die Färbung für Sulfatid. Nach insgesamt 16 bzw. 21 Tagen in Kultur (entspricht einem 16 Tage alten Tier) hatten 95 Prozent der mit mGalC-markierten Zellen gleichzeitig auch rSulf an ihre Zelloberfläche gebunden. Bei nahezu allen Oligodendrozyten wurde Sulfatid zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wie GalC auf der gesamten Zelloberfläche einschließlich ihrer Fortsätze vorgefunden. Auch bei den Färbungen an Oligodendrozyten in Kultur war die Expression des Sulfatids auf die GalC-positive Oligodendrozytenpopulation beschränkt. Dabei nahm der Anteil der rSulf-positiven Zellen in der GalC-posiven Oligodendrozytenpopulation mit der Zeit in Kultur zu.
In Abb.14 und Abb.15 ist die oben beschriebene Beobachtung photographisch dokumentiert: Während der frühen Entwicklungsphasen der Oligodendrozyten ist die Markierung des Sulfatids auf GalC-positive Zellen beschränkt. Die Morphologie der Oligodendrozyten ist noch nicht ausgereift.

Abb.14 Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid an sich entwickelnden Oligodendrozyten in Kultur

Kulturen aus dem Cortex neugeborener Ratten wurden nach 2 Tagen in Kultur mit rSulf (1:30), Rd-GAR-IgG (Nordic,1:50) mGalC I (ascites 1:1000) und Fl-GAM-Ig (Nordic,1:50) inkubiert und anschließend mit Äthanol/Eisessig fixiert. Oligodendrozyten mit verzweigten Fortsätzen exprimieren GalC an ihrer gesamten Zelloberfläche. Die Expression von Sulfatid ist bei einem der dargestellten Oligodendrozyten kaum wahrnehmbar auf den Zellkörper beschränkt (Pfeil).

(a. mGalC, b. rSulf, c. Phasenkontrast; Skalenstrich 10 µm



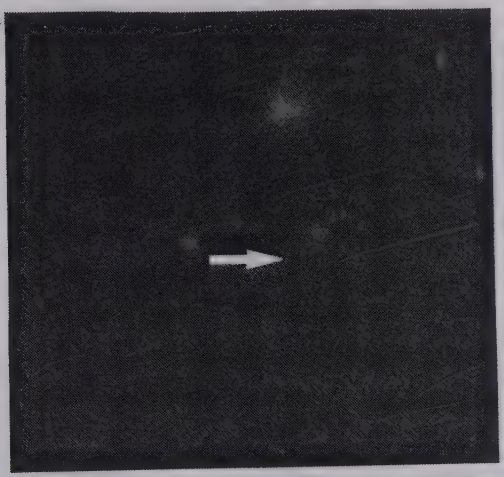
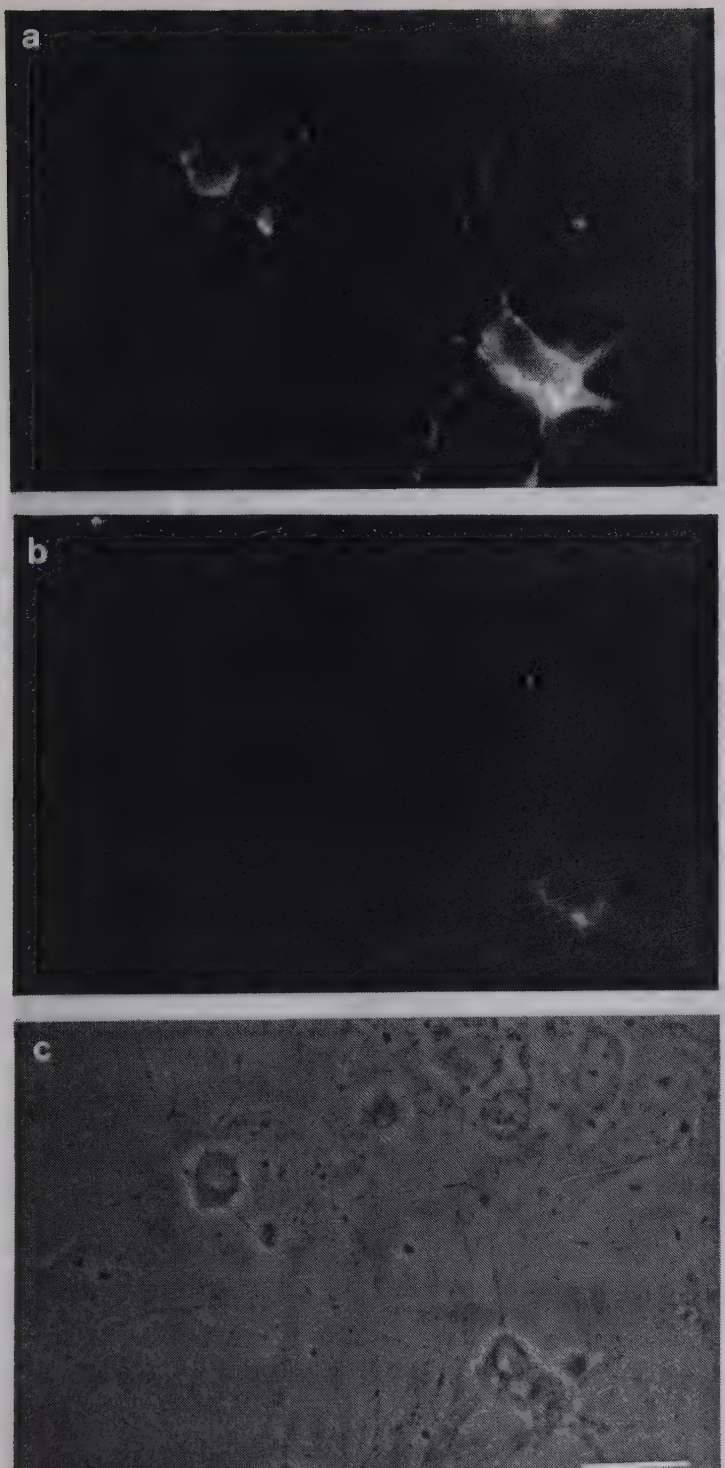


Abb.15 Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid an sich entwickelnden Oligodendrozyten in Kultur

Kulturen aus dem Cortex neugeborener Ratten wurden nach 5 Tagen in vitro mit rSulf (1:30), Rd-GAR-IgG (Nordic,1:50), mGalC I (Ascites, 1:1000) und Fl-GAM-IgG (Nordic,1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig(95:5) fixiert. Einer der gezeigten GalC-positiven Oligodendrozyten hat noch kein Sulfatid ausgebildet.
(a. mGalC, b. rSulf, c. Phasenkontrast; Skalenstrich 10um)


a
b
c

Die Reifung der Oligodendrozytenpopulation verläuft nicht synchronisiert über einen längeren Zeitraum.Aus diesem Grund kann zunächst nur eine kleine GalC-positive Zellpopulation identifiziert werden, die sich jedoch mit fortschreitender Entwicklung vergrößert. Sulfatid findet sich zunächst nur an den älteren Zellen der Population und wird schließlich von nahezu allen Oligodendrozyten exprimiert (95% der GalC-positiven Zellen bei Zellen im Alter eines 16 Tage alten Tieres). Die an Zellen in Kultur und in Suspension untersuchte Expression der Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid zeigt in Übereinstimmung, daß GalC als erstes der beiden Lipide ausgeprägt wird. Wegen der anfänglich sehr kleinen Zahl der GalC-positiven Oligodendrozyten, ist es schwierig eine absolute Aussage über den Zeitpunkt des Auftretens dieses Moleküls während der Entwicklung des Nervensystems zu treffen.
Aus den zuvor beschriebenen Experimenten wird jedoch ersichtlich, daß die ersten GalC-positiven Zellen im Cortex der Ratte bei neugeborenen bis einen Tag alten Tieren auftreten und daß Sulfatid gegenüber GalC mit einer zeitlichen Verzögerung von 1-2 Tagen ausgeprägt wird.

3.5. Expression von GalC und Sulfatid auf den Oberflächen sich entwickelnder Schwann-Zellen in Kultur

Die Expression von GalC und Sulfatid auf den Oberflächen der an der peripheren Myelinisierung beteiligten Schwann-Zellen wurde an Kurzzeitkulturen aus dem Ischias-Nerv verschieden alter Ratten und Rattenembryonen untersucht.
Nach der Excision des Nervs und der enzymatischen Auflösung des Zellverbands wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Zwölf bis sechzehn Stunden nach diesem Zeitpunkt wurde die Bindung der mGalC- und rSulf-Antikörper an die Zelloberflächen der Schwann-Zellen in indirekter Doppelimmunfluoreszenz untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8 Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid an Schwann-Zellen in Kurzzeitkulturen

Alter (Tage)	Galaktocerebrosid	Sulfatid
Embryonal		
15	-	-
17	-	-
18	-	-
19	+	-
post partum		
0 (neugeboren)	+	+ (80 %)
2	+	+ (84 %)
5	+	+ (89 %)

Die Zahlen in Klammern geben den Prozentsatz Sulfatid-markierter Zellen in der GalC-positiven Population an

Die erste positive Reaktion der Schwann-Zellen zeigt sich in Kurzzeitkulturen aus 19 Tage alten Rattenembryonen. Die Bindung von rSulf-Antiserum an die wenigen GalC-positiven Zellen (im Mittel waren es zwei aus einer Gesamtzahl von 2×10^4 ausplattierten Zellen) wird zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet.Bei neugeborenen und älteren Tieren zeigen 80-90 Prozent der mit mGalC gefärbten Zellen auch Sulfatid an ihrer Oberfläche.

Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß auch die Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems die Myelin-spezifischen Galaktosphingolipide mit einer zeitlichen Verzögerung ausprägen. Auch die Schwann-Zellen exprimieren Sulfatid nur an GalC-positiven Zellen. Dabei nimmt die Größe der GalC- und Sulfatid-positiven Zellpopulation wie im ZNS mit dem Fortschreiten der Entwicklung zu bis ein konstanter Wert erreicht ist. Die Entwicklung im PNS beginnt etwas früher als im ZNS.

3.6. Zeitabhängiger Verlust der Galaktosphingolipide von Schwann-Zelloberflächen in neuronenfreien Kulturen aus dem Ischias-Nerv

Schwann-Zellen verlieren in Abwesenheit neuronaler Signale ihre Myelin-spezifischen Komponenten. In den hier beschriebenen Experimenten wurde die Frage untersucht, ob der Verlust der Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid - als eine Umkehrung der Entwicklung - mit einer zeitlichen Verschiebung erfolgt.
Neuronenfreie Schwann-Zellkulturen wurden aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten erhalten. Wie zuvor demonstriert wurde (Tabelle 8),sind in solchen Kulturen nach 12 - 16 Stunden in vitro die meisten der GalC-positiven Zellen auch positiv für Sulfatid. In der hier durchgeführten Versuchsreihe wurden Paralellkulturen nach jeweils 20, 40, 60 und 100 Stunden in indirekter Doppelimmunfluoreszenz mit monoklonalem mGalC I und Kaninchen-Antiserum rSulf auf die Expression dieser Galaktosphingolipide untersucht.
Die Beobachtungen sind tabellarisch zusammengefaßt.

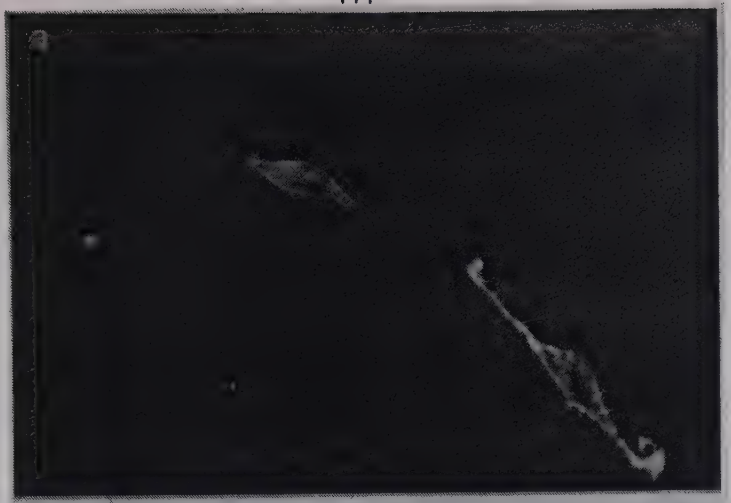
Tabelle 9 Verlust der Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid in neuronenfreien Schwann-Zellkulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten

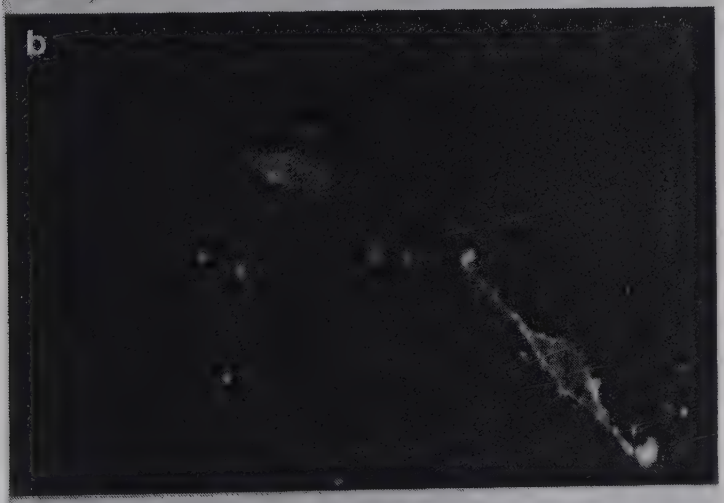
Zeit in Kultur (Stunden)	Sulfatid-positive Zellen (% GalC-positiver Zellen)
20	95
40	32
60	14
100	0

In neuronenfreien Kulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten wird der Verlust der Expression der Myelin-spezifischen Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid beobachtet. Dabei verlieren die Schwann-Zellen - in Umkehrung der Entwicklung - das später in ihrer Membran identifizierbare Sulfatid schneller von den Zelloberflächen als GalC.
Auch in diesen Kulturen wird deshalb Sulfatid nur an den GalC-positiven Zellen gefunden. Die Prozentzahl der Sulfatid-positiven Zellen - bezogen auf alle GalC-exprimierenden Schwann-Zellen - verringert sich in Abhängigkeit von der Kulturdauer (Tabelle 9).
In Abb.17 sind zwei GalC-positive Schwann-Zellen nach 40 Stunden in Kultur gezeigt, nur noch eine dieser Zellen ist gleichzeitig positiv für Sulfatid.

Abb.17 Zeitabhängiger Verlust der Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid von Schwann-Zellen in neuronenfreien Kulturen

Kulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten wurden nach 40 Stunden in Kultur nacheinander mit rSulf (1:30) Fl-GAR-IgG (Nordic,1:50), mGalC (Ascites, 1:1000) und Rd-GAM-IgG3 (Nordic,1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig fixiert.
Nur eine der mit mGalC gefärbten Schwann-Zellen ist noch positiv für Sulfatid
(a. mGalC, b. rSulf, c.Phasenkontrast; Skalenstrich 10µm)


a


b

c

Teil II UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG ZENTRALER NEURONEN

In diesem Teil der Arbeit werden Untersuchungen zur Beeinflussung der neuronalen Differenzierung durch nicht-neuronale Zellen beschrieben. Als Voraussetzung für diese Studien wird ein Kultursystem entwickelt, in dessen chemisch definierter, serumfreier Umgebung die Neuronen räumlich von den nicht-neuronalen Zellen getrennt werden können. Als Modell wird der embryonale Ratten-Hippocampus gewählt. Durch Arbeiten von G.Banker und W.M.Cowan (G.Banker and W.M.Cowan, 1977) ist bekannt, daß sich in Kulturen aus den Hippocampus von 18 - 19 Tage alten Rattenembryonen nur die Neuronenpopulation entwickelt, die zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits ihren letzten Teilungszyklus abgeschlossen hat. Unter den genannten Bedingungen sind dies die Pyramiden-Neuronen des Hippocampus proper.

1. Vorversuche zur Schaffung optimaler Grundvoraussetzungen für die Kultivierung von Hippocampus-Zellen

Die Entwicklung neuraler Zellen in Kultur ist abhängig von einer Reihe variabler Parameter : Dem Entwicklungsstand des gewählten Versuchstieres, der Vorbehandlung der Zellen von der Auflösung des Zellverbandes bis zum Erhalt einer Einzelzellsuspension, der Zelldichte beim Ausplattieren, der Wahl eines für das Anheften der Zellen geeigneten Kultursubstrates und einem mit allen essentiellen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versehenem Kulturmedium. Für die Kultivierung embryonaler Ratten-Hippocampi wurden die genannten Parameter optimiert und der Kulturerfolg anhand der folgenden Kriterien beurteilt :

a). dem Anheften der Zellen an das angebotene Kultursubstrat
b). der morphologischen Differenzierung der Zellen
c). der Überlebensdauer der Zellen in Kultur.

1.1. Dissoziation des Zellverbandes

Für die Auflösung des Zellverbandes der Hippocampi aus 18 - 19 Tage alten Rattenembryonen wurden verschiedene Enzyme mit nachfolgender mechanischer Behandlung ausgetestet.
Das Hippocampus-Gewebe wurde für jeweils 20 Min. bei 37°C mit den Enzymen Kollagenase (1% in DMEM), Dispase (1% in DMEM) oder Trypsin (0,05% in DMEM)/EDTA (0,02% in DMEM) behandelt und anschließend durch Homogenisation in Pasteurpipetten mit zunehmend kleiner werdenden Öffnungsweiten dissoziiert.
Die Einwirkung der Dispase oder Kollagenase führte zur nur unvollständigen Auflösung des Zellverbands (Klumpen) und zum Erhalt von Zelldebris. Durch die Verwendung von Trypsin/EDTA hingegen konnte eine Einzelzellsuspension ohne nennenswerte Mengen Debris erhalten werden . Die Auflösung des Gewebes ohne vorherige Enzymbehandlung und umgekehrt die Enzymbehandlung ohne nachfolgende mechanische Dissoziation führten nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

1.2. Kulturmedium und Kultursubstrat

In dieser Versuchsreihe wurden dissoziierte Hippocampus-Zellen auf verschiedenen Kultursubstraten und in Kulturmedien mit Wachstumsfaktoren aus unterschiedlichen Quellen kultiviviert.
Das Hippocampus-Gewebe aus 18 - 19 Tage alten Rattenembryonen wurde durch Einwirken von Trypsin/EDTA (20 Min. bei 37°C) und durch anschließende mechanische Homogenisation in Pasteurpipetten mit zunehmend verengten Öffnungen vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in einer Dichte von 2 - 5 x 10^5 Zellen pro Kulturschale (35 mm Durchmesser) in DMEM ausgesät. Wachstumsfaktoren wurden in fötalem Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviertem Pferdeserum (PSI) oder Hühnerembryoextrakt (HEE) zugesetzt. Zwei verschiedene Kombinationen von Wachstumsfaktoren wurden als Modifikation der von G.Banker und W.M.Cowan (G.Banker and W.M.Cowan, 1977) und der von J.Peacock (J.Peacock et al.,1979a und 1979b) beschriebenen Kulturmedien be-

testet. Das von G.Banker und W.M.Cowan verwendete menschliche Plazentaserum wurde - in Ermangelung einer Bezugsquelle für dieses Serum - durch fötales Kälberserum substituiert. Bei der Modifikation des von J.Peacock verwendeten Mediums wurden die Serumkonzentrationen von jeweils 10% auf 5% verringert.

Die modifizierten Kulturmedien setzten sich folgendermaßen zusammen :

Medium I : DMEM mit 5% FKS und 5% PSI
Medium II : DMEM mit 23% FKS und 9% HEE

Diese Kulturmedien wurden alle 4-7 Tage erneuert.

Als Substrat für das Anheften der primären Hippocampus-Zellen wurden alternativ Poly-L-Lysin (E.Yavin and Z.Yavin, 1974) oder Kollagen (M.Bornstein, 1958; D.Simkovic, 1959) angeboten.

Die Beobachtungen von drei unabhängigen Experimenten, in denen für die Kultivierung der Hippocampus-Zellen die Medien I und II mit den verschiedenen Kultursubstraten kombiniert wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9 : Hippocampus-Zellen in vitro : Abhängigkeit des Kulturbilds von der Kulturunterlage und der Quelle der Wachstumsfaktoren

		Angeheftete Zellen nach 60 Min.	Aggregat-bildung	Debris	Überlebens-dauer
Medium I	Poly-L-Lysin	+++	-	-	8 Wochen
	Kollagen	(+)	+	-	8 Wochen
Medium II	Poly-L-Lysin	++	-	+	8 Wochen
	Kollagen	(+)	+	+	8 Wochen

Die Wertung +++,++,+,(+) und - repräsentiert die Größe der angehefteten Teilpopulation in abnehmender Reihenfolge. Bei der Aggregat- und Debrisbildung wird nicht nach Größe unterschieden, die Beobachtung wird positiv'+' oder negativ '-' bewertet.

Zum Erhalt einer aggregat- und debrisfreien Einzelzellkultur schien aufgrund der in Tabelle 9 zusammengefassten Beobachtungen als Kulturunterlage Poly-L-Lysin und als Kulturmedium Medium I mit PSI und FKS als Quelle für Wachstumsfaktoren besser geeignet. Bei Verwendung von Medium II wurde unabhängig von der Kulturunterlage während der gesamten Kulturdauer Debris vorgefunden - auch zusätzliches sorgfältiges Zentrifugieren des diesem Medium zugefügten Hühnerembryoextraktes führte nicht zu einer Verbesserung des Kulturbildes. Auf kollagenbeschichteten Kulturplatten bildeten die Hippocampus-Zellen vor dem Anheften an dieses Substrat Aggregate aus, die sich nur langsam an die Unterlage anhefteten; nach 60 Min. in Kultur waren nur wenige Zellen an die Unterlage gebunden. Die Verwendung von Poly-L-Lysin führte zum schnellen Anheften vereinzelter Zellen an dieses Substrat und bot somit günstigere Voraussetzungen für die Beobachtung der morphologischen Differenzierung einzelner Zellen.

1.3. Zelldichte

Hippocampus-Gewebe aus 18 - 19 Tage alten Rattenembryonen wurde wie unter 1.2. beschrieben dissoziiert und die resultierende Zellsuspension in unterschiedlicher Dichte auf Poly-L-Lysin-beschichteten Kulturschalen (35mm Durchmesser) ausplattiert. Bei der Wahl eines Dichtebereiches von 0,5 - 10 x 10^5 Zellen pro Kulturschale wurden die in Tabelle 10 zusammengefaßten Beobachtungen gemacht.

Tabelle 10 Einfluß der Zelldichte auf das Ausbilden von Zellaggregaten und die Überlebensdauer von Hippocampus-Zellen in Kultur

Zelldichte (x10^5)	Aggregatbildung	Kulturdauer länger als 48 Stunden
0,5	-	-
1	-	-
2	-	+
4	-	+
8	+	+
10	+	+

Für das Studium der neuronalen-glialen Wechselwirkung bietet eine aggregatfreie Langzeitkultur günstige Voraussetzungen. Diese Bedingung wurde für Hippocampus-Zellen nach dem Aussäen der Zellsuspension in einem Dichtebereich zwichen 2 - 4 x 10^5 Zellen pro Kulturschale vorgefunden. Für alle weiteren, in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit Hippocampus-Kulturen wurden die Zellen in diesem Dichtebereich ausplattiert.

2. Entwicklung der Hippocampus-Zellen in vitro

2.1. Kulturbild in Gegenwart von Serum

Hippocampi aus 18 - 19 Tage alten Rattenembryonen wurden wie unter 1.2. beschrieben dissoziiert und in einem Dichtebereich von 2 - 4 x 10^5 Zellen / Kulturschale (35 mm Durchmesser) in Medium I auf der Poly-L-Lysin-Unterlage ausplattiert. Die Morphologie der Zellen in diesen Kulturen wurde nach verschiedenen Zeitintervallen photographisch festgehalten. In Abb. 18 ist das Kulturbild nach 2 Stunden, 48 Stunden und nach 4 Wochen dokumentiert.

Bild a zeigt die Hippocampus-Zellsuspension nach zwei Stunden in vitro. Zellen unterschiedlicher Größe haben sich an die Unterlage angeheftet, einige Zellen beginnen Fortsätze auszubilden (Pfeile). Zu diesem Kulturzeitpunkt wird häufig Zelldebris beobachtet, welcher sich jedoch nach längerer Kulturdauer - wahrscheinlich durch die Aktivität der Mikrogliazellen und durch das ständige Erneuern des Kulturmediums - verringert und schließlich ganz verschwindet. Bild b zeigt eine Kultur aus dem gleichen experimentellen Ansatz nach 48 Stunden in Kultur. Die meisten Zellen haben sich zu diesem Zeitpunkt auf der Kulturunterlage ausgebreitet, einige Zellen tragen bereits längere Fortsätze. Die im Vergleich zu Bild a verringerte Zellzahl ist wahrscheinlich im Absterben einiger Zellen begründet. Bild c und d zeigen Ausschnitte aus vier Wochen alten Kulturen. Zellen mit Fortsätzen, die in ihrer Morphologie sich entwickelnden Pyramiden-Neuronen

in vivo ähneln (Pfeile), haben sich auf der Poly-L-Lysin-Unterlage (Abb.d) oder auf einem Rasen flacher Zellen (Abb.c) angeheftet. Die unterschiedliche Morphologie der Fortsätze-tragenden Zellen erlaubt die Annahme, daß es sich um Zellen verschiedener neuraler Klassen (z.B. Oligodendrozyten und Neuronen) handeln könnte. Die Entwicklung der in Abb.c und d gezeigten Zellen in Kulturen, die sich ursprünglich wie in Abb. b dargestellt haben, zeigt, daß die Ausprägung der für die Differenzierung neuraler Zellen typischen Morphologie unter der gewählten Kulturbedingung erst nach einer Zeitverzögerung von mehreren Tagen beginnt.

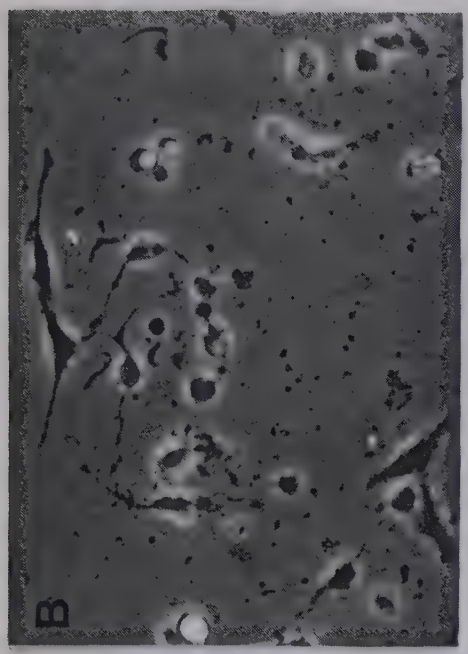
2.2. Zelluläre Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen in Gegenwart von Serum

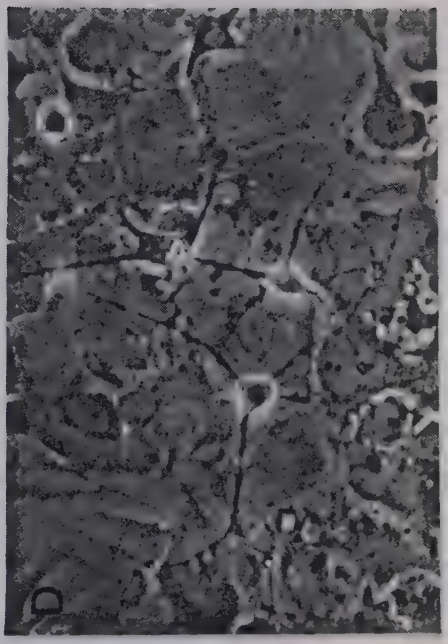
Die Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen aus den verschiedenen neuralen Zellen wurde unter Anwendung von Antikörpern gegen zellspezifische Markermoleküle untersucht. Astrozyten wurden aufgrund der Bindung eines Kaninchen-Antiserums gegen GFAP (A.Bignami et *al.*,1972) identifiziert, Oligodendrozyten aufgrund der Markierung mit dem in Teil I dieser Arbeit beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen Galaktocerebrosid und Neuronen aufgrund der Bindung von Tetanustoxin (R.Mirsky et *al.*,1978).

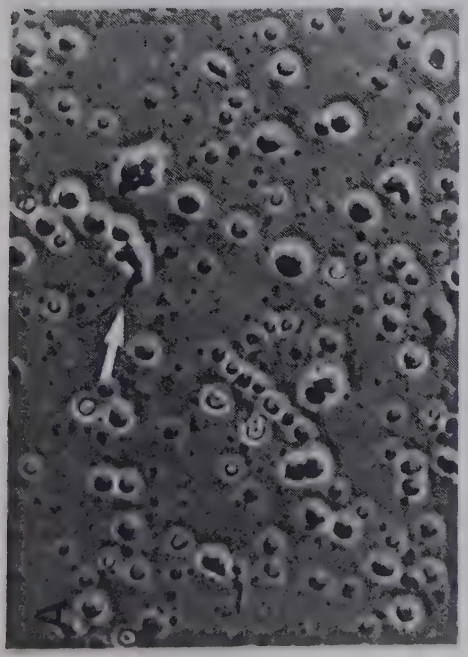
Die Hippocampus-Zellen aus 18-19 Tage alten Rattenembryonen wurden wie unter 1.2. beschrieben dissoziiert und in einer Dichte von $2 - 4 \times 10^5$ Zellen pro Kulturschale auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (7 runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 mm passen in eine 35 mm Kulturschale) ausplattiert. Nach 5 - 10 Tagen in Kultur wurden die Zellen durch Anwendung indirekter Immunofluoreszenz für Membranantigene (GalC) oder intrazelluläre Antigene (GFAP) markiert. Für die Identifizierung der Neuronen wurde die Immunperoxidase-Methode eingesetzt, in diesem Experiment wurden 5 Tage alte Kulturen verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 19 - 21 dargestellt und in Tabelle 11 zusammengefaßt.

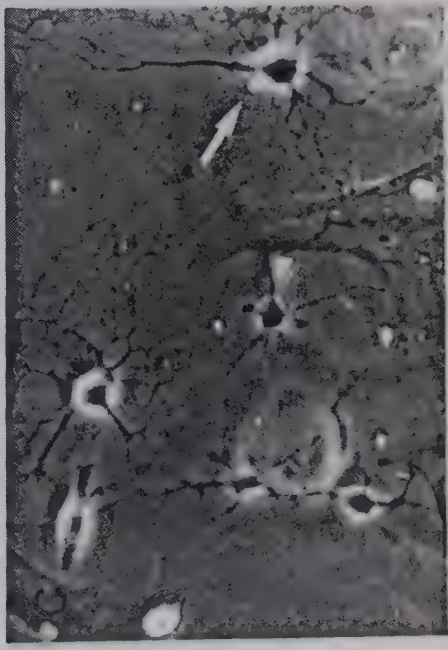
Abb.18 Morphologie primärer Hippocampus-Zellen nach verschiedener Kulturdauer in Medium I

a). nach 2 Stunden b).nach 48 Stunden und c).und d). nach vier Wochen in Kultur
Skalenstrich : 10 µm


B


D


A



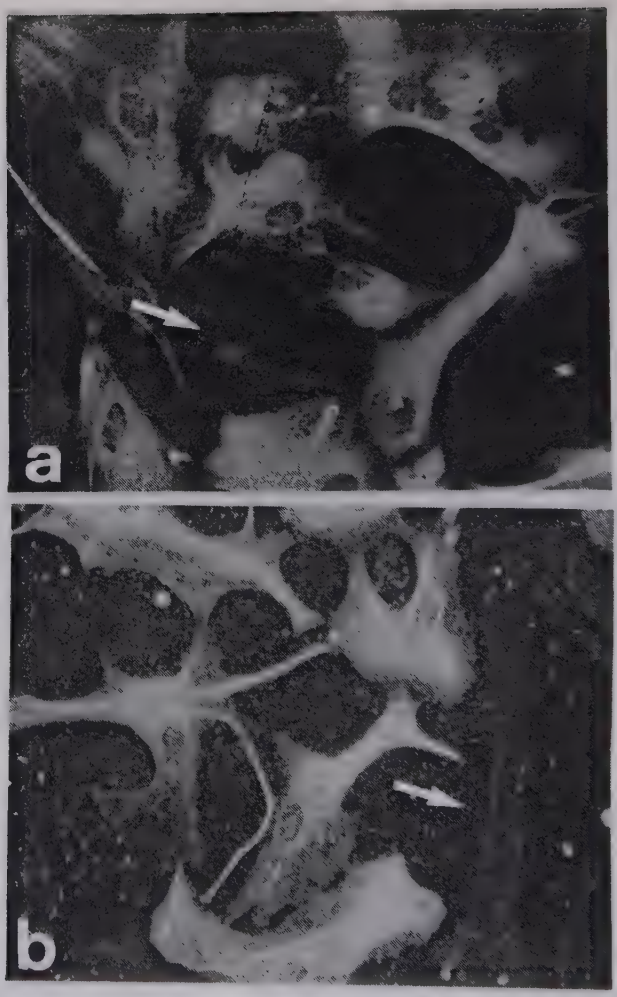


Abb.19 Identifikation von Astrozyten in Hippocampus-Kulturen aus 18-19 Tage alten Rattenembryonen mit Kaninchen Antiserum gegen GFAP.

Nach 10 Kulturtagen in serumhaltigem Medium I wurden die Zellen mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert und anschließend mit rGFAP (1:50) und Fl-GAR-IgG (1:50) inkubiert. Astrozyten binden das Antiserum an GFA-Protein (gefärbte Zellen). Zellen mit Fortsätzen (Abb. 19a, Pfeile) und große flache Zellen (Abb.19b, Pfeil) sind nicht gefärbt.

Abb.20 Identifikation von Neuronen durch Tetanustoxinbindung

Kulturen aus 18 - 19 Tage alten embryonalen Ratten-Hippocampi wurden nach 5 Tagen in Medium I mit 2% Paraformaldehyd fixiert und nacheinander mit Tetanustoxin (4µg/ml), Maus-Antitoxin (1:100) und Peroxidase-gekoppeltem GAM-IgG (1:50) inkubiert. Durch Umsetzung des Enzymsubstrats Diaminobenzidin und H_2O_2 bildet sich ein feiner granulärer Belag um neuronale Zellen (Pfeile). Der aus Astrozyten bestehende Zellrasen unter den Neuronen ist nicht gefärbt.

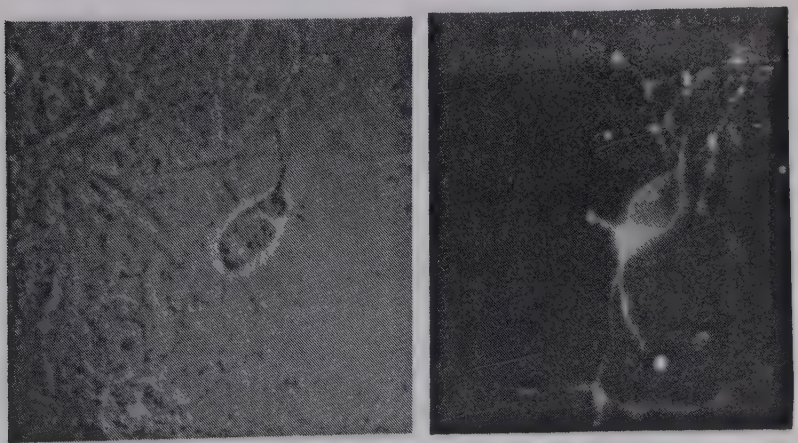


Abb.21 Identifikation von Oligodendrozyten durch Bindung eines monoklonalen Antikörpers gegen Galaktocerebrosid

Kulturen aus 18 - 19 Tage alten embryonalen Ratten-Hippocampi wurden nach 10 Tagen in Medium I mit mGalC (Ascites, 1:1000) und Fl-RAM-IgG (1:50) inkubiert und mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Nur wenige Zellen in diesen Kulturen sind Oligodendrozyten.

Unter der gewählten Kulturbedingung, in Gegenwart von Serum, entwickeln sich überwiegend protoplasmatische Astrozyten : Mehr als 90 Prozent der gesamten Zellen in diesen Kulturen binden das Kaninchen-Antiserum gegen GFAP an ihre intermediären Filamente. Bei den in Abb. 19a dargestellten Zellen, die das Kaninchen-Antiserum nicht gebunden haben, könnte man aufgrund morphologischer Kriterien (Fortsätze) Neuronen oder Oligodendrozyten vermuten (Abb.19a, Pfeile) . Die große flache, mit GFAP-Antiserum nicht gefärbte Zelle in Abb.19b (Pfeil) ist vermutlich ein Fibroblast oder eine Leptomeninges-Zelle.

In Abb.20 sind aufgrund der Bindung von Tetanustoxin identifizierte Neuronen dargestellt. Nach 5 Tagen in Kultur zeigen diese Zellen die noch nicht ausgereifte Morphologie pyramidaler Neuronen (G.Banker and W.M.Cowan, 1979). Die nicht markierten Zellen im Hintergrund sind protoplasmatische Astrozyten. Die Neuronenpopulation in dem hier beschriebenen Kultursystem aus dem Hippocampus ist sehr klein, sie macht nur etwa 3 Prozent der gesamten Zellen aus.
Nur wenige der Zellen in diesen Kulturen sind Oligodendrozyten: ihr Anteil beträgt nach 10 Tagen in Kultur 2 Prozent. Ein Beispiel eines mit mGalC angefärbten Oligodendrozyten auf einer Astrozyten-Unterlage ist in Abb.21 dargestellt.

In Tabelle 11 ist die prozentuale Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen aus den verschiedenen neuralen Zellen zusammengefaßt. Für die Erstellung dieser Tabelle wurden jeweils 20 mikroskopische Felder von je zwei Kulturen nach 10 Tagen in vitro ausgezählt.

Kulturen aus dem Hippocampus embryonaler Ratten zeigen in Gegenwart von Serum eine heterogene zelluläre Zusammensetzung. In diesen Mischkulturen dominieren protoplasmatische Astrozyten, es entwickelt sich nur eine kleine Neuronenpopulataion.

Tabelle 11 Zelluläre Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen in Gegenwart von Serum

Zelltyp	Markermolekül	Prozent positiver Zellen
Astrozyten	GFAP	94,1
Neuronen	Ganglioside GD_{1b},GT_1	3,3
Oligodendrozyten	GalC	2,0
andere Zellen	----	<1

2.3. Etablierung einer Neuronenkultur in serumfreiem, chemisch definiertem Kulturmedium

Ein Kultursystem, das für die Untersuchung von selektiv auf die neuronale Entwicklung wirkenden Faktoren besser geeignet ist , als das zuvor beschriebene, konnte durch Modifizierung der Kulturbedingungen erhalten werden.
Unter Beibehaltung der optimierten Grundvoraussetzungen für die Kultivierung der Hippocampus-Zellen - Alter der Rattenembryonen, Dissoziation der Hippocampi, Beschichtung der Kulturunterlage und Zelldichte - wurden zwei Veränderungen vorgenommen :

1. Die Substitution des Serums durch chemisch definierte Hormone und Spurenelemente
2. Die Trennung der Neuronenpopulation von den Astrozyten durch die Entwicklung der 'Transfer-Technik'.

A. Selektion eines serumfreien, chemisch definierten Kultur-Mediums

Bei der Wahl einer geeigneten Hormonkombination für die Kultivierung von Hippocampus-Zellen wurde zunächst die Frage gestellt, ob Hippocampus-Zellen in einem chemisch definierten Kulturmedium ohne Serum überhaupt überleben können.

Hippocampus-Zellen wurden nach der Dissoziation in einer Dichte von 2 - 4 x 10^5 Zellen pro Kulturschale (35 mm Durchmesser) auf Poly-L-Lysin ausplattiert (siehe Kapitel 1 dieses Teils der vorliegenden Arbeit) und für 11 Tage in serumhaltigem Medium I kultiviert. Nach dieser Zeit zeigten die Kulturen die zuvor dokumentierte Zusammensetzung und Morphologie. Am 12. Kulturtag wurde das serumhaltige Kulturmedium I durch serumfreies, chemisch definiertes Hormonmedium ersetzt. Kontrollkulturen erhielten frisches Medium I. Die Hormone wurden in der von P.Honegger (P.Honegger et al.,1979) vorgeschlagenen Kombination (Hormonkombination A) zugesetzt.

Hormonkombination A :

Insulin	5	ug/ml
Hydrocortison	20	nM
Triiodothyronin	0,3	nM
Transferrin	1	ug/ml

Es sind jeweils die Endkonzentrationen im Kulturmedium angegeben.
Die Morphologie der in serumfreiem Medium mit Zusätzen von Hormonen der Kombination A kultivierten Hippocampus-Zellen wurde beobachtet und mit den in Medium I belassenen Zellen aus dem gleichen Versuchsansatz verglichen. Während der Dauer dieses Versuches wurde das Kulturmedium nicht mehr erneuert.

Zwei Wochen nach dem Wechsel des Kulturmediums zeigten die Kulturen in serumfreiem Hormonmedium ein mit den in Medium I kultivierten Kontrollkulturen vergleichbares morphologisches Bild (siehe dazu Abb.18c). Zellen mit Fortsätzen (Neuronen und Oligodendrozyten) waren auf dem von Astrozyten dominierten Zellrasen angeheftet.
Diese Ergebnis zeigt , daß das serumhaltige Kulturmedium durch serumfreies substituiert werden kann ohne die Morphologie und die Überlebensdauer der Hippocampus-Kulturen zu verändern.

B. Wirkung serumfreier Hormonmedien auf die Entwicklung von Hippocampus-Zellen in Kultur

In diesen Experimenten wurde getestet, ob und wie serumfreie Hormonmedien die frühe Entwicklung der Hippocampus-Zellen in Kultur beeinflussen.
In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 2×10^5 Hippocampus-Zellen pro Kulturschale (35 mm Durchmesser) in serumfreien Hormonmedien auf Poly-L-Lysin-beschichteten Kulturschalen oder Deckgläschen ausplattiert. Die Hormone wurden in der zuvor genannten Kombination A nach Honegger oder in der von J.Bottenstein und G.Sato (J.Bottenstein and G. Sato, 1979) erprobten Kombination B verwendet.

Hormonkombination B :

Insulin	5	µg/ml
Transferrin	100	µg/ml
Progesteron	20	nM
Putrescin	100	µM
Selenium	30	nM

Es sind jeweils die Endkonzentrationen im Kulturmedium angegeben.
Die Entwicklung der in serumfreien Hormonmedien ausplattierten Hippocampuszellen wurde verfolgt und mit in serumhaltigem Medium I kultivierten Zellen verglichen.
Nach 24 Stunden in vitro wurde beobachtet, daß eine Teilpopulation der Zellen in serumhaltigem Medium I - wie zuvor beschrieben - mit der Ausbildung von Fortsätzen begonnen hatte. Im Gegensatz dazu waren die Zellen in den serumfreien Hormonmedien abgerundet geblieben. Ein zu diesem Zeitpunkt durchgeführter Vitalitätstest mit dem Farbstoff Trypanblau (0,2% in PBS) zeigte, daß die Mehrzahl der Zellen abgestorben ist.

Auch schon nach 4 Stunden in Kultur sind die Zellen in den Hormonmedien irreversibel geschädigt : Das Überführen von auf Deckgläschen ausplattierten Hippocampus-Zellen aus den Hormonmedien in serumhaltiges Medium I führt nicht zur Differenzierung der Zellen, die Zellen bleiben abgerundet.

C. Entwicklung von Hippocampus-Zellen in serumfreiem Kulturmedium

Die zuvor beschriebenen Experimente haben den Einfluß serumfreier Hormonmedien auf Hippocampus-Zellen in Kultur demonstriert : Die Bedingungen für die Entwicklung von Hippocampus-Zellen in vitro sind in Gegenwart des Hormonmediums allein nicht ausreichend; in schon entwickelten Kulturen erweist sich jedoch die Substitution des Serums durch eine Hormonmischung nicht als Nachteil für die Fortsetzung der Kulturdauer.
Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß bei der anfänglichen Entwicklung der Hippocampus-Zellen in Kultur Faktoren , die nicht mit den verwendeten Hormonen identisch sind, eine Rolle spielen. Eine mögliche Quelle für solche Faktoren sind die in den Hippocampus-Kulturen enthaltenen Astrogliazellen. Unter Anwendung der 'Transfer-Technik' konnte der Einfluß dieser Zellen auf die Entwicklung von Hippocampus-Zellen in Kultur untersucht werden.

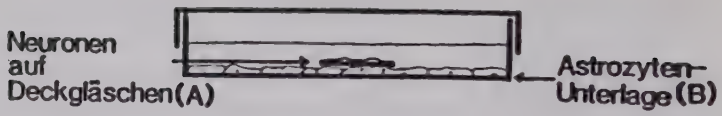
Bei den hier beschriebenen Untersuchungen wurden die Hippocampus-Zellen auf Deckgläschen ausplattiert, die dann in serumfreie Astrozyten-Kulturen übertragen wurden (Abb.22 oben).

Die Astrozyten stammten aus den cerebralen Cortices von 1-2 Tage alten Ratten. Die vereinzelten Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Kulturschalen (50 mm Durchmesser) in serumhaltigem Medium I kultiviert, bis sich ein fast geschlossener Zellrasen gebildet hatte. In der Regel wurden die Zellen aus dem Cortex eines Tieres für zwei solcher Kulturen verwendet. Das Kulturmedium wurde alle 3-4 Tage erneuert.
Mit dem für Astrozyten spezifischen Antiserum gegen GFAP und Fluorescein-konjugiertem Anti-Kaninchen IgG wurde der Anteil der Astrozyten in diesen Kulturen bestimmt : In den Kulturen aus dem Cortex von 1 Tag alten Ratten waren etwa 95 % der Zellen protoplasmatische Astrozyten.
Die Astrozyten hatten nach etwa 7-14 Tagen in Kultur einen nahezu geschlossenen Zellrasen ausgebildet. Solche Kulturen wurden 3 Mal mit serumfreiem DMEM und einmal mit serumfreiem Hormonmedium (die Hormone wurden in der Kombination A verwen-

det) gewaschen. In letzterem Medium wurden die Kulturen für 24 Stunden belassen. Nach dieser Zeit wurde das Hormonmedium erneuert und für weitere 48 Stunden konditioniert : Von Astrozyten produzierte, diffusible Faktoren wurden in das überstehende Kulturmedium abgegeben.

Hippocampus-Zellen aus 18-19 Tage alten Rattenembryonen wurden nach der Dissoziation in einer Dichte von 2-3 x 10^5 Zellen pro Kulturschale (35 mm Durchmesser) auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen (10 mm Durchmesser) ausgesät. Zum Ausplattieren wurde das serumhaltige Medium I mit 5% FKS und 5% PSI eingesetzt. Nach dem Anheften der Zellen - nach 60 Min. in vitro - wurde jeweils ein Deckgläschen mit den noch abgerundeten Hippocampus-Zellen in eine der serumfreien, konditionierten Astrozytenkulturen überführt.

Der Einfluß der von glialen Zellen produzierten, diffusiblen Faktoren auf die Differenzierung von Hippocampus-Zellen in Kultur wurde 48 Stunden nach dem Übertragen der auf Deckgläschen angehefteten Hippocampus-Zellen examiniert.
Durch die gewählten serumfreien Versuchsbedingungen hatte sich das morphologische Bild der Hippocampus-Kulturen entscheidend verändert : Es entwickelten sich fast ausschließlich Zellen mit Fortsätzen, die nach zwei weiteren Tagen in Kultur ein für Neuronen typisches Netzwerk ausgebildet hatten. Die im nächsten Kapitel dieser Arbeit beschriebenene Identifikation dieser Zellen bestätigte, daß sich unter der genannten Kulturbedingung überwiegend neuronale Zellen aus dem Hippocampus entwickeln.
In Abb. 22 wird ein repräsentativer Ausschnitt einer Hippocampus-Kultur in serumfreiem , von Gliazellen konditioniertem Medium gezeigt. Unter A ist das morphologische Bild der Hippocampus-Kultur nach 48 Stunden in vitro dargestellt: Neuronale Zellen haben ein Netzwerk ausgebildet. Der unter den Neuronen liegende Astrozytenrasen liegt nicht in der Focussierebene. Bei Änderung der Focussierung werden die Cortex-Astrozyten sichtbar (B).



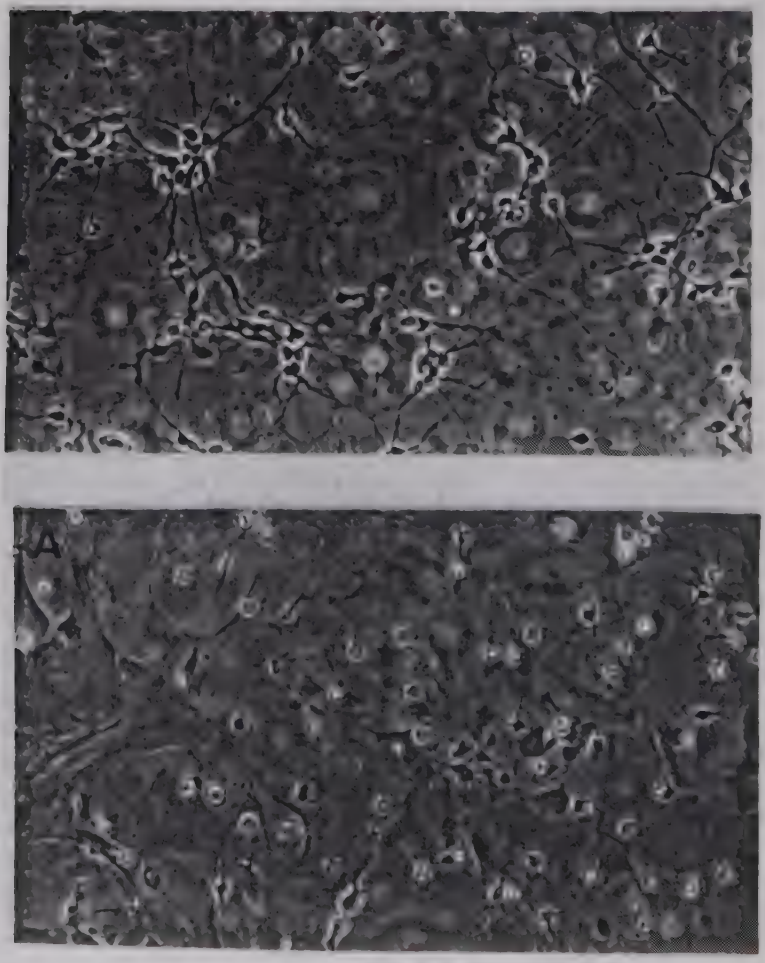


Abb.22 A. Hippocampus-Neuronen nach 48 Stunden in der serumfreien, von Astrozyten konditionierten Umgebung : Die Neuronen haben ein Netzwerk ausgebildet.
B. Astrozyten-Unterlage: Nach insgesamt 14 Tagen in Kultur haben die Zellen einen geschlossenen Rasen gebildet.

2.4. Zelluläre Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen in serumfreiem Medium

Die Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen aus den verschiedenen neuralen Zellen wurde unter Anwendung von Antikörpern gegen zellspezifische Markermoleküle untersucht. Für die Identifizierung von Neuronen wurde das monoklonale Antiserum gegen das nur im ZNS vorkommende Antigen A4 (J.Cohen and Y.Selvendran, 1981) verwendet. Die Astrozyten wurden aufgrund der Bindung eines Kaninchen-Antiserums gegen GFAP identifiziert und Oligodendrozyten wurden mit dem in Teil I dieser Arbeit beschriebenen monoklonalen Antikörper gegen Galaktocerebrosid markiert.

Die Hippocampus-Zellen wurden wie zuvor beschrieben auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausplattiert und nach dem Anheften - nach 60 Min. - in serumfreie, von Glia-Zellen konditionierte Kulturen übertragen. Nach 3 Tagen in Kultur hatten die Zellen ein Netzwerk ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen unter Anwendung der indirekten Immunfluoreszenz-Methode auf ihre zelluläre Zusammensetzung untersucht. Die Kulturen wurden nach der Inkubation mit den an Zelloberflächen-Antigene bindenden monoklonalen Antikörpern gegen A4 oder Galaktocerebrosid und dem entsprechenden Fluorochromkonjugat (Rd-GAM-Ig) mit Äthanol/Eisessig (95:5) fixiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit dem Kaninchen-Antiserum gegen das intrazellulär lokalisierte, Astrozyten-spezifische GFAP und Fluorescein-gekoppeltem Anti-Kaninchen IgG. Unter einem Leitz Fluoreszenz-Mikroskop mit eingebautem Zählgitter wurden jeweils 8 mikroskopische Felder von jeweils 8 unabhängigen Hippocampus-Kulturen ausgezählt. Das Ergebnis dieser Analyse ist tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle 12).
In serumfreien Kulturen aus den Hippocampi 18-19 Tage alter Rattenembryonen entwickeln sich unter dem Einfluß von Faktoren, die von Gliazellen produziert und in das überstehende Kulturmedium abgegeben werden, in der Mehrzahl Neuronen (90%). Daneben findet sich eine kleine Astrozytenpopulation (9%).

Der Anteil anderer neuraler Zellen ist in diesen Kulturen sehr klein: Nur selten können Oligodendrozyten gefunden werden. Diese Zellen beginnen jedoch zum untersuchten Zeitpunkt - das Alter der Zellen entspricht etwa dem neugeborener Ratten - erst mit der Ausbildung der Myelin-spezifischen Komponenten (siehe Teil I dieser Arbeit). Große flache, von ihrer Morphologie her als Fibroblasten oder Meninges-Zellen zu identifizierende Zellen kommen,unter den genannten serumfreien Kulturbedingungen nicht vor.

Tabelle 12 Zelluläre Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen in serumfreiem Hormonmedium

Zelltyp	Markermolekül	Prozent positiver Zellen
Neuronen	A4	89,7
Astrozyten	GFAP	9,3
Oligodendrozyten	GalC	<1
andere	--	<1

Abb.23 zeigt die Markierung der Hippocampus-Zellen in den serumfreien Kulturen nach 3 Tagen in vitro. In Bild a ist ein Aggregat neuronaler Zellen mit dem monoklonalen Antikörper gegen A4 angefärbt. Bild b zeigt einen GFAP-positiven Astrozyten. Die Morphologie der sich in serumfreiem Medium entwickelnden Astrozyten erscheint fibrillär.

3. Rolle der Gliazellen bei der neuronalen Differenzierung

Das beschriebene serumfreie Kultursystem für Zellen aus dem Hippocampus bietet wegen des chemisch definierten Mediums und der räumlichen Trennung der Neuronen von der Astrozyten-Unterlage optimale Voraussetzungen zum Studium der Beeinflussung der neuronalen Differenzierung durch diffusible Faktoren.

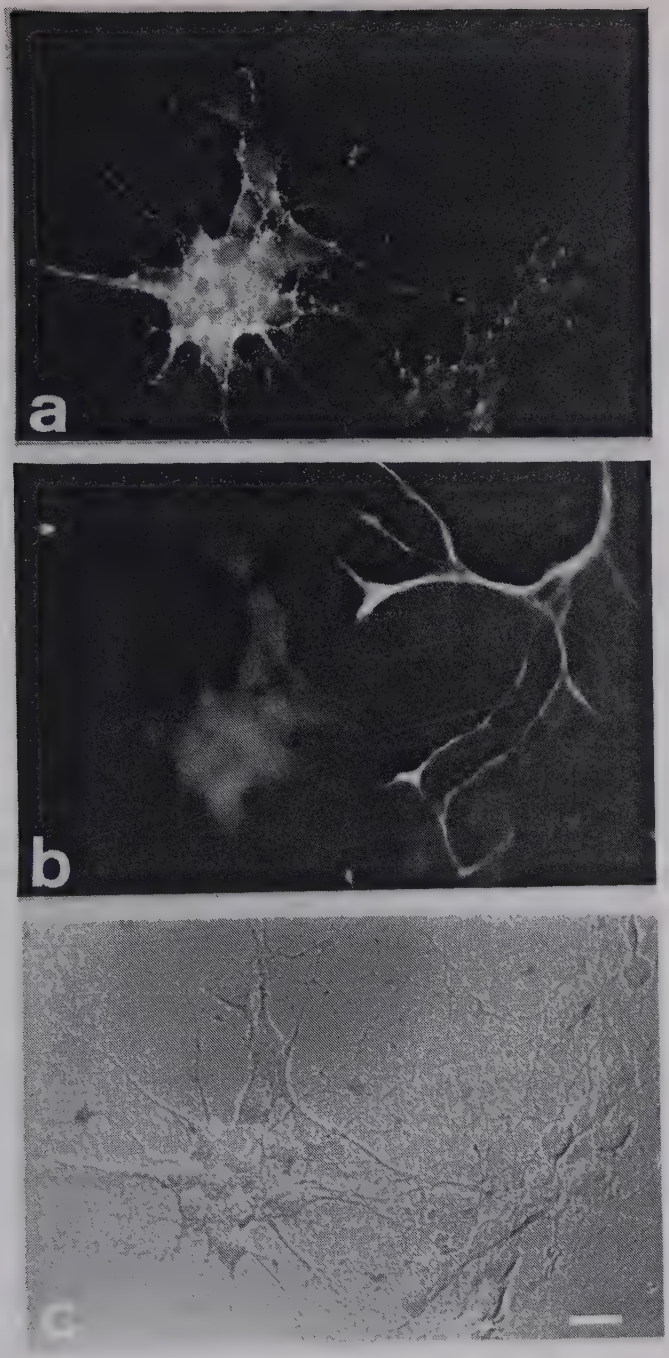


Abb.23 Indirekte Immunofluoreszenz von Hippocampus-Zellen in serumfreiem Medium nach 3 Tagen in Kultur
a). A4-markierte Neuronen b). GFAP-positiver Astrozyt
c). Phasenkontrast Skalenstrich 10µm

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß diffusibler Faktoren auf die Ausbildung von Neuriten und die Überlebensdauer der Hippocampus-Neuronen untersucht. Als Quelle für diffusible Faktoren wurden primäre Astrozyten aus dem Cortex neugeborener Ratten, Astrozytoma-Linien oder Fibroblasten eingesetzt.

Dissoziierte Hippocampus-Zellen aus 18-19 Tage alten Rattenembryonen wurden in einer Dichte von 2-3 x 10^5 Zellen pro Kulturschale (35 mm Durchmesser) auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen ausplattiert. Die in Medium I angehefteten Zellen wurden nach 60 Min. in vitro in serumfreie Astrozyten- oder Fibroblastenkulturen oder alternativ in von Astrozyten oder Fibroblasten konditionierte Medien überführt. Die primären Astrozyten wurden wie zuvor beschrieben aus den Cortices neugeborener Ratten isoliert. Die Astrozytoma-Linien C 6 (P.Benda et al.,1968) und B 12 (D.Schubert et al., 1974) sowie 3T3-Fibroblasten (G.J.Todaro and H.Green, 1963) sind permanente Zellinien. Alle Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz in serumhaltigen Kulturmedien kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen - wie unter Punkt 2.3.C dieser Arbeit beschrieben - gewaschen und für 48 Stunden in serumfreiem DMEM mit Hormonen der Kombination A konditioniert. Für einige Versuchsbedingungen wurden die für 48 Stunden konditionierten Kulturüberstände der primären oder transformierten Astrozyten und der Fibroblasten zu 50 Prozent mit frischem Hormonmedium verdünnt und in eine neue Kulturschale (50 mm Durchmesser) pipettiert.
Frisch angeheftete Hippocampus-Zellen wurden in die serumfreien Kulturen oder in zellfreie, konditionierte Kulturmedien überführt. Der Einfluß der verschiedenen, von diesen Zellen produzierten und in das überstehende Kulturmedium abgegebenen Faktoren auf das Auswachsen neuronaler Fortsätze wurde 48 Stunden nach dem Überführen der Hippocampus-Zellen in die serumfreien Medien examiniert. Die Überlebensdauer der Kulturen unter allen Versuchsbedingungen wurde vermerkt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tabelle 13 Wirkung diffusibler Faktoren auf das Auswachsen von Neuriten und die Überlebensdauer von Hippocampus-Neuronen in vitro

	Quelle diffusibler Faktoren	Neuriten	Überleben in vitro
Kulturen	primäre Astrozyten	+++	7 Tage
	C 6	++	7 Tage
	B 12	++	7 Tage
	3T3	-	-
Konditionierte Medien (50% in Hormonmedium A)	primäre Astrozyten	++	3 Tage
	C 6	+	3 Tage
	B 12	+	3 Tage
	3T3	-	-
Kontrollen	Medium I	-	-
	Hormonmedium A	-	-

Die morphologische Differenzierung der Hippocampus-Neuronen wird durch diffusible, von Astrozyten ins Kulturmedium abgegebenen Faktoren beeinflußt.
Dabei scheinen primäre Astrozyten stärker auf die Ausbildung neuronaler Fortsätze zu wirken als permanente Zellinien. Die Verwendung konditionierter Medien führt zu weniger ausgeprägten Effekten : Das neuronale Netzwerk ist weniger gut ausgebildet, die Überlebensdauer der Neuronen ist verkürzt. Bei dieser Beobachtung muß die Konzentration der konditionierten Medien beachtet werden : Sie beträgt in diesen Experimenten nur 50 Prozent.
Die aktiven Faktoren sind nicht mit Serumfaktoren identisch, da das Übertragen der angehefteten Hippocampus-Zellen in serumhaltiges Medium I nicht zur Ausbildung eines neuronalen Netzwerks führt. Ebenso wird durch die Verwendung des Hormonmediums ohne zusätzliche Konditionierung durch Zellen des Astrozytentyps die Ausbildung neuronaler Fortsätze unterdrückt.

In einem zusätzlichen Experiment wurde untersucht, ob die Ausbildung des Neuronennetzes von der Konzentration des aktiven, von Astrozyten produzierten Faktors abhängig ist. Vor dem Übertragen der frisch angehefteten Hippocampus-Zellen wurden primäre Astrozytenkulturen - unter Beibehaltung aller zuvor beschriebenen Kulturbedingungen - für 12, 24, 36 und 48 Stunden in serumfreiem Hormonmedium A konditioniert.
Nach 12 Stunden Konditionierung reichte die Menge der von den primären Astrozyten produzierten Faktoren nicht aus, um die Ausbildung eines neuronalen Netzwerkes zu induzieren. Wurden die aktiven Faktoren hingegen durch Konditionierung für 24 - 48 Stunden weiterhin angereichert, bildeten sich die zuvor gezeigten (Abb.22A) Neuritennetze aus. Dieses Ergebnis indiziert die Konzentrationsabhängigkeit der Faktorwirkung.

Die Überlebensdauer der Hippocampus-Zellen ist unter den genannten Kulturbedingungen im Vergleich zu der Kultivierung in serumhaltigem Medium sehr kurz. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob das Überführen der Hippocampus-Neuronen in frische, serumfreie, von Astrozyten konditionierte Kulturen die Überlebensdauer der Zellen verlängern kann. Kulturen aus dem Hippocampus wurden wie zuvor beschrieben in serumfreiem Hormonmedium auf einem Astrozytenrasen kultiviert und nach 5 Tagen in neue, serumfreie Astrozyten-Kulturen übertragen. Unter dieser Bedingung konnte das neuronale Netzwerk für weitere 5 Tage in Kultur gehalten werden ohne die Morphologie zu ändern.

Aus den hier beschriebenen Experimenten wird ersichtlich, daß die Ausbildung neuronaler Fortsätze bei den Hippocampus-Neuronen von diffusiblen Faktoren abhängig ist, die von Astrozyten produziert werden.

V. DISKUSSION

Teil I UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG VON OLIGODENDROZYTEN UND SCHWANN-ZELLEN

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Frage, welche der Myelin-spezifischen Komponenten während der Entwicklung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen als erste ausgeprägt wird. Dabei war durch Arbeiten von R.Mirsky und Mitarbeitern (R.Mirsky et al.,1980) schon bekannt, daß die wichtigsten Myelin-spezifischen Proteine erst dann zu finden sind, wenn die Galaktosphingolipide Galaktocerebrosid und Sulfatid bereits exprimiert werden. Die Auflösung der zeitlichen Aufeinanderfolge dieser Glykolipide sollte es somit möglich machen, die erste spezifische, während der Entwicklung der Oligodendrozyten und Schwann Zellen auftretende Myelinkomponente zu identifizieren.

Die genannte Fragestellung war mit immunologischen Methoden nur durch die Etablierung monoklonaler Antikörper gegen mindestens eines der Myelin-spezifischen Galaktosphingolipide zu bearbeiten: Mit spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern und polyklonalen Antiseren aus einer anderen Tierspezies können durch Doppelmarkierungen verschiedene Moleküle auf der gleichen Zelle lokalisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen das Myelin-spezifische Galaktocerebrosid etabliert. In Doppelmarkierungen mit Kaninchen-Antiseren gegen Sulfatid wurde die Expression der beiden Galaktosphingolipide während der Entwicklung der Oligodendrozyten und Schwann-Zellen verfolgt. Im Zusammenhang mit den Befunden von R. Mirsky und Mitarbeitern indizieren die hier beschriebenen Ergebnisse, daß Galaktocerebrosid als erste der Myelin-spezifischen Komponenten in sich entwickelnden Myelinmembranen exprimiert wird.

Monoklonale Antikörper gegen Galaktocerebrosid wurden nach der Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit einer synaptischen Plasmamembran-Fraktion etabliert. Dieses Ergebnis ist überraschend, denn nach der Immunisierung mit dieser Fraktion sollte man eigentlich Antikörper gegen eine Reihe neuronaler Komponenten erwarten.
Die heterogene Zusammensetzung der synaptischen Plasmamembranfraktionen ist ein bekanntes und bisher nicht zufriedenstellend gelöstes Problem bei der Analyse Synapsen-spezifischer Moleküle. Dabei sind es in der Regel gliale Membranen, die diese Fraktionen kontaminieren (E.Mena et al., 1980). Es ist eine durchaus realistische Annahme, daß für die Etablierung monoklonaler Antikörper gegen Galaktocerebrosid eine Myelinkontaminante in den synaptischen Plasmamembran-Fraktionen ausschlaggebenden Einfluß auf die Immunantwort der Mäuse genommen hat. Auch in einem anderen Laboratorium wurden nach der Immunisierung von Mäusen mit synaptischen Plasmamembranen monoklonale Antikörper gegen gliale Komponenten isoliert (M.Schachner, 1981).
Die Ausbeute an an spezifische Antikörper produzierenden Hybridomakolonien war in der hier beschriebenen Fusion sehr klein : Von 80 proliferierenden Kolonien in vier Kulturplatten zeigten nur die Antikörper in den Kulturüberständen von zwei Kolonien im ELISA eine Reaktion mit dem Immunogen. Wie die spätere Charakterisierung zeigte, waren die Antikörper beider Kolonien in allen getesteten Eigenschaften absolut identisch : Beide Antikörper sind Immunglobuline der Klasse IgG 3 und zeigen absolut identische zelluläre und molekulare Spezifitäten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper und Antiseren gegen Sulfatid die zeitliche Verschiebung bei der Expression dieser Galaktosphingolipide in sich entwickelnden Oligodendozyten- und Schwann-Zellmembranen aufgelöst. Für die hier gemachte Aussage ist die genaue Kenntnis der zellulären und molekularen Spezifität der verwendeten Antikörper von kritischer Bedeutung.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen Galaktosphingolipide wurden sorgfältig auf ihre molekulare Spezifität und mögliche Kreuzreaktionen untersucht. Für diese grundlegende Analyse war ein sensitives Testsystem erforderlich.

Die Spezifität der monoklonalen mGalC-Antikörper für die Myelin-bildenden Zellen des ZNS und PNS wurde durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen bekannte zellspezifische Markermoleküle (A4, GFAP, Thy1.1, GalC) demonstriert. Die Spezifität der Kaninchen-Antiseren gegen Sulfatid für Oligodendrozyten und Schwann Zellen war im Laboratorium von Prof. M.C.Raff gezeigt worden und wurde mit Hilfe der mGalC-Antikörper bestätigt.

Ein bekanntes Testsystem für die Charakterisierung von Antikörpern gegen Glykolipide ist ihre Adsorption an Cholesterol/Lecithin-Mizellen, in die das zu untersuchende Lipid eingebaut wird (B.Niedick, 1975). In diesem System ist jedoch eine quantitative Aussage nur mit Vorbehalten möglich, da die erhaltenen Antikörpertiter immer vom Mizellen/Antikörper-Verhältnis abhängen und die Antikörper häufig unspezifische Bindung an Kontrollmizellen zeigen.
Für die Charakterisierung der hier verwendeten Antikörper wurde das bekannte ELISA-Testsystem für Sphingolipide modifiziert. Dieses neue System erwies sich als sehr sensitv und ließ auch geringe Kreuzreaktionen erkennen. Im Vergleich zu Titern, die durch Immunfluoreszenz an GalC-positiven Oligodendrozyten erhalten wurden, zeigten die Antikörper im ELISA um mehr als zehnfach erhöhte Titer .

Die Reaktivitäten aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen Sphingolipide wurden im ELISA an durch präparative Dünnschichtchromatographie gereinigten Lipiden analysiert (Tabelle 6).

Die Charakterisierung der Antigenspezifität der monoklonalen mGalC-Antikörper im ELISA zeigt die Reaktivität mit Galaktocerebrosid. Gleichzeitig werden aber auch Psychosin und in geringerem Maße Sulfatid erkannt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß diese Kreuzreaktivitäten die hier gemachte Aussage über die sequentielle Expression von Galaktocerebrosid und Sulfatid in sich entwickelnden Oligodendrozyten und Schwann-Zellen beeinflussen :
Psychosin ist keine Komponente der Oligodendrozyten - oder Schwann-Zellmembran (L.Sarlieve, 1981); nur in einem biochemischen in vitro - Testsystem kommt die Kreuzreaktivität der monoklonalen mGalC-Antikörper mit diesem Lipid zum Ausdruck. Für die Bindung der Antikörper an Oligodendrozyten- und Schwann-Zellmembranenen spielen nur die in diesen Membranen vorkommenden Komponenten eine Rolle. Zudem zeigt der Kaninchen-Antikörper rGalC, der nur geringfügig mit Psychosin kreuzreagiert (Tabelle 6) in Doppelimmunfluoreszenzen mit mGalC ein von mGalC nicht zu unterscheidendes Färbemuster : Beide Antikörper binden an Oligodendrozyten- und Schwann-Zell-Oberflächen bevor diese mit rSulf angefärbt werden können.
Auch die im Vergleich zu GalC und Psychosin um den Faktor 16 geringere Kreuzreaktivität von mGalC mit Sulfatid ist für die Interpretation der hier dargestellten Ergebnisse unbedeutend : Blockierungs- und Kompetitionsexperimente mit mGalC und rSulf (Kapitel 3.2) haben gezeigt, daß bei den für die Experimente verwendeten Antikörper-Verdünnungen keine Konkurrenz um die Bindungsstellen besteht.
Die Möglichkeit einer Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper mit dem in Myelinfraktionenen des Huhns und des Menschen identifizierten Gangliosid GM_4 (Addition eines Sialinsäurerestes in der Position 3 des Zuckers der Galaktocerebrosids) (R.W.Ledeen et al., 1980) kann - die Bindung der mGalC-Antikörper an das gereinigte Gangliosid konnte wegen der mangelnden Verfügbarkeit dieses Lipids nicht getestet werden - nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Eine Reaktion von mGalC mit GM_4

ist jedoch unwahrscheinlich, da die mGalC-Antikörper nicht an eine Gangliosidmischung binden (Tabelle 4) und GM_4 im Nervensystem der Ratte, dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchstier, nicht vorzukommen scheint (R.W.Ledeen et al. , 1980).
Die Möglichkeit, daß mGalC-Antikörper ein Protein der Oligodendrozyten-Membran erkennt, wurde durch Autoradiographie an einer sequentiell mit mGalC und ^{125}J-RAM-IgG inkubierten, auf SDS-Polyacrylamid getrennten Myelinfraktion unwahrscheinlich : Nach dem Entwickeln des Autoradiogramms war keine der Myelinbanden geschwärzt (vorläufige Beobachtung).

Die biochemische Charakterisierung der monoklonalen mGalC-Antikörper läßt auf die bei der Bindung von mGalC erkannte Determinante schließen: Es ist eine Galaktose gebunden an einen aliphatischen Rest einer Fettsäure. Das Vorhandensein der Galaktose ist eine unbedingte Voraussetzung für die Bindung der monoklonalen mGalC-Antikörper : Die mGalC-Antikörper zeigen keine Reaktion mit dem GalC sehr ähnlichen Glukocerebrosid, bei dem anstelle der Galaktose Glukose mit dem Ceramid verbunden ist. Die Anzahl der Fettsäurereste scheint für die Bindung der Antikörper unbedeutend zu sein, da mGalC-Antikörper mit gleichem Titer an Galaktocerebrosid (Galaktose mit zwei Fettsäureresten) und Pychosin (Galaktose mit einem Fettsäurerest) binden. Eine in der Position 3 des Zuckers addierte negative Ladung in Form eines Sulfatrestes erniedrigt die Titer der monoklonalen Antikörper um den Faktor 16. Die zuckerfreien Sphingolipide (Ceramid, Sphingosin) werden nicht erkannt.

Die Spezifitäten und Kreuzreaktivitäten von Kaninchen-Antiseren gegen Galaktocerebrosid und Sulfatid (aus den Laboratorien von Prof.S.Liebowitz und Prof.M.Raff) wurden ebenfalls im ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich, daß eines dieser Antiseren, rSulf I , welches nach Immunisierung eines Kaninchens mit synthetischem Galaktocerebrosid gewonnen worden war, heteroklitisch war, d.h. es zeigte einen höheren Titer für den Sulfatester des Galaktocerebrosids

als für das eigentliche Immunogen.
Die verwendeten Kaninchen-Antiseren reagieren wie die mGalC-Antikörper nur mit Galaktosphingolipiden; Glukocerebrosid, Ganglioside und zuckerfreie Sphingolipide werden nicht erkannt. Die Titer der Kaninchen-Antiseren für die entsprechenden Galaktolipide sind im Vergleich zu den mit monoklonaler Ascitesflüssigkeit erhaltenen um etwa eine Zehnerpotenz geringer. Die Kreuzreaktivitäten sind auch für die Kaninchen-Antiseren um den Faktor 16 kleiner als die prinzipielle Reaktivität.

Durch Doppelimmunfluoreszenz-Studien mit den monoklonalen Antikörpern gegen Galaktocerebrosid und Kaninchen-Antiseren gegen Sulfatid wurde die zeitliche Aufeinanderfolge dieser Sphingolipide während der Entwicklung der Myelin-bildenden Zellen untersucht. Die experimentellen Daten indizieren, daß GalC als erste der beiden Myelin-spezifischen Komponenten in den Membranen differenzierender Oligodendrozyten und Schwann Zellen exponiert wird.
Die ersten Oligodendrozyten aus dem sich entwickelnden Ratten-Cortex können aufgrund der Bindung der mGalC-Antikörper in neugeborenen Tieren identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine sehr kleine Zellpopulation (8 Zellen aus 1000). Die Zahl der mGalC-positiven Zellen nimmt mit dem Fortschreiten der Entwicklung zu bis eine konstante Zahl erreicht wird. Sulfatid wird aufgrund der Bindung von rSulf-Antikörpern erstmals an Cortex-Zellen von Ratten im Alter von 3 Tagen identifiziert. Dabei wird dieses Galaktolipid nur an einer Teilpopulation von Zellen, die bereits GalC ausgeprägt haben, gefunden. Mit dem Fortschreiten der Entwicklung nimmt die Größe der Sulfatid-positiven Zellen in der GalC-exprimierenden Oligodendrozyten-Population zu bis schließlich ein überlappendes Bild entsteht.
Interessant ist die Beobachtung, daß Sulfatid zunächst nur an den Zellkörpern der Oligodendrozyten gefunden wird, bevor sich dieses Lipid über die gesamte Zellmembran verteilt. (Abb. 14). Ob diese Beobachtung eine Bedeutung für den anabolen Stoffwechsel von Sulfatid hat,müssen künftige Arbeiten zeigen.

Vergleichbare Ergebnisse zur Expression von GalC und Sulfatid wurden durch Untersuchungen in Zellkultur und in frisch isolierten Zellsuspensionen aus dem Cortex verschieden alter Rattenembryonen und junger Tiere erhalten. Dieser Befund bestätigt die Beobachtung von E.R.Abney und Mitarbeitern (E.R.Abney et al., 1981), daß die Entwicklung von Oligodendrozyten in vivo und in vitro genau parallel verläuft.

Die Differenzierung der Myelin-bildenden Zellen des PNS beginnt früher als im ZNS.Schwann Zellen aus dem Ischias-Nerv exponieren bereits am 19. Tag der Embryonalentwicklung Galaktocerebrosid in ihren Membranen (mGalC-positive Zellen); Sulfatid wird erst in neugeborenen Tieren gefunden (rSulf-positive Zellen). Wie im ZNS ist auch im PNS die Expression des Sulfatids gegenüber der des Galaktocerebrosids um etwa zwei Tage verzögert.
Diese zeitliche Verzögerung der Expression des Sulfatids wird auch beim Verschwinden der Myelin-spezifischen Moleküle von Schwann-Zellen in Kultur beobachtet. Es ist bekannt, daß Schwann-Zellen ihre Myelin-spezifischen Moleküle nur in Gegenwart eines kontinuierlich wirkenden axonalen Signals zeigen (R.Mirsky et al., 1980). In neuronenfreien Kulturen aus dem Ischias-Nerv neugeborener Ratten wurde gezeigt, daß das zuletzt in die Membran eingebaute Sulfatid auch zuerst wieder von den Oberflächen der Schwann-Zellen eliminiert wird. Galaktocerebrosid verschwindet mit einer Verzögerung von etwa zwei Tagen. Die Bedeutung dieser Beobachtung für den katabolen Stoffwechsel der beiden Galaktosphingolipide kann derzeit noch nicht geklärt werden.

Durch die hier dargestellten Ergebnisse wird das bisherige Konzept der Parallelität der Expression der Galaktosphingolipide während der Entwicklung der Myelin-bildenden Zellen in Frage gestellt.
In einer biochemischen Analyse des sich entwickelnden optischen Nerven der Ratte (G.I.Tennekoon et al.,1980) wurde die simultane Expression von GalC und Sulfatid und der diese Lipide synthetisierenden Enzyme UDP-Galaktose-Ceramid-Galaktosyltransferase und Cerebrosid-Sulfotransferase sowie der

2',3'-cyklischen-Nukleotid 3'Phosphodiesterase und des basischen Proteins postuliert. Ob die von G.I.Tennekooen gewählte biochemische Methode für die Auflösung der zeitlichen Aufeinanderfolge der Myelin-spezifischen Moleküle geeignet ist, ist fragwürdig. Die Entwicklung einer gegebenen Oligodendrozyten- oder Schwann-Zellpopulation verläuft nicht synchronisiert über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Während also eine Teilpopulation bereits die Charakteristika differenzierter Zellen angenommen hat, beginnen andere Zellen in der gleichen Population erst mit der Ausprägung der ersten zellspezifischen Moleküle. Die geringfügigen Unterschiede im Gehalt der Galaktosphingolipide GalC und Sulfatid zu Beginn der Differenzierung der Myelin-bildenden Zellen liegen vermutlich unterhalb der Nachweisgrender verwendeten biochemischen Methode und können deshalb von Tennekoon und Mitarbeitern nicht gesehen werden.

In einer anderen Studie mit Kulturen aus dem zentralen und peripheren Nervensystem wurde aufgrund indirekter Fluoreszenzfärbungen mit Kaninchen-Antiseren gegen GalC und Sulfatid von R.Mirsky und Mitarbeitern (R.Mirsky et al., 1980) gefolgert,daß die beiden Galaktosphingolipide zum gleichen Zeitpunkt während der Entwicklung der Myelin-bildenden Zellen ausgeprägt werden. Myelin-spezifische Proteine wurden erst zu späteren Entwicklungszeitpunkten identifiziert. Mit den von R.Mirsky et al. verwendeten Antiseren aus der gleichen Tierspezies waren Doppelfärbungen in indirekter Immunfluoreszenz nicht möglich, die genannte Untersuchung mußte deshalb in Parallelkulturen durchgeführt werden. Diese Art der Analyse ist für das Aufspüren der nur geringen Zeitverschiebung bei der Expression der Galaktosphingolipide zu ungenau, da zu Beginn der Differenzierung der Myelin-bildenden Zellen zunächst nur eine sehr kleine Zellpopulation die spezifischen Moleküle trägt. Die von R.Mirsky und Mitarbeitern durchgeführten Zählungen der GalC- und Sulfatid-positiven Zellen sind deshalb großen Schwankungen unterworfen. Der Vergleich der Anzahl der GalC- und Sulfatid-tragenden Zellen führt wegen der Schwankungen des in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Systems nicht zu dem richtigen

Schluß. Ein weiteres Problem bei der von R.Mirsky getroffenen Schlußfolgerung über die Expression der Myelin-Lipide könnte die unzureichende Charakterisierung der für diese Analyse verwendeten Antiseren darstellen. Ein in dieser Arbeit verwendetes Kaninchen-Antiserum gegen 'Galaktocerebrosid', das aus dem gleichen Laboratorium stammt, erwies sich nach sorgfältiger Charakterisierung in zwei verschiedenen Testsystemen als Antiserum gegen Sulfatid.

Erst durch die in dieser Arbeit beschriebenen Doppelfärbungen mit charakterisierten Antikörpern aus verschiedenen Tierspezies war es möglich, beide Lipide, GalC und Sulfatid, gleichzeitig an einer individuellen Zelle zu lokalisieren und so Unterschiede in der zeitlichen Expression dieser Moleküle aufzuspüren.

Die von R.Mirsky et al. beobachtete Zeitverschiebung bei der Expression der Myelin-Proteine war groß genug, um sie in dem von diesen Autoren benutzten Testsystem mit signifikantem Ergebnis aufzulösen. Die Beobachtung, daß die Myelin-spezifischen Proteine erst dann identifizierbar werden, wenn die Lipide GalC und Sulfatid bereits ausgeprägt sind, führt zusammen mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen zu dem Schluß, daß GalC als erste der bekannten Myelin-spezifischen Komponenten in den Membranen sich entwickelnder Oligodendrozyten und Schwann Zellen exprimiert wird.

Für die Entwicklung der zellspezifischen Funktionen der Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, der Ausbildung des Myelins, stellt sich die Frage nach den molekularen Mechanismen, die diesem Vorgang zugrunde liegen. Es ist durchaus denkbar, daß dem Galaktocerebrosid als erster der Myelin-spezifischen Komponenten eine tragende Schlüsselrolle zukommt. Die Funktion dieses Sphingolipids kann mit Hilfe der monoklonalen Antikörper erfolgversprechend bearbeitet werden. Ein erstes Experiment könnte dabei die Blockierung des Lipids durch die mGalC-Antikörper in einem kontrollierbaren, Myelin-bildenden Kultursystem (P.Wood et al., 1980) sein.

Teil II UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG ZENTRALER NEURONEN

Ziel des vorliegenden Teils der Arbeit war die Entwicklung eines primären Kultursystems aus dem ZNS, mit dem grundlegende Fragen nach den auslösenden Mechanismen des Neuritenwachstums beantwortet werden können.

Als experimentelles System wurde der Hippocampus embryonaler Ratten gewählt. Von anderen Autoren (G.Banker and W.M.Cowan, 1977) war beobachtet worden, daß sich in Kulturen aus dem Hippocampus-Gewebe 18 - 19 Tage alter Rattenembryonen in einem reichhaltigen Kulturmedium,mit menschlichem Plazentaserum und Hühnerembryoextrakt, nur Neuronen des Pyramiden-Typs entwickeln. Diese Zellen zeigen unter den von diesen Autoren verwendeten Kulturbedingungen die Morphologie vollständig ausdifferenzierter Neuronen. Das weiterreichende Interesse dieser Arbeit führt zu den Fragen, welche Komponenten die Ausbildung der Neuriten und Dendritenbäumchen ausschlaggebend beeinflussen und welcher genetischen Kontrolle dieser Vorgang unterliegt.
Da im menschlichen Plazentaserum und im Hühnerembryoextrakt viele verschiedene Wachstumsfaktoren vorhanden sind, ist es schwierig, die von Banker und Cowan gemachten Beobachtungen auf einen oder mehrere definierte Moleküle zurückzuführen.
Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war deshalb die Entwicklung übersichtlicher Kulturbedingungen, unter denen die an der neuronalen Differenzierung beteiligten Komponenten analysiert und identifiziert werden können.
Ein System, das diesen Anspruch erfüllt, ist die Kultivierung neuraler Zellen in serumfreien, chemisch definierten Kulturmedien (J.Bottenstein and G.Sato, 1979) : Durch die Kontrollierbarkeit der Versuchsbedingungen ist es möglich, den Einfluß einzelner Faktoren zu untersuchen. Bei der Etablierung eines experimentellen Systems mit einer möglichst geringen Anzahl variabler Parameter ist die Kultivierung einer homogenen Zellpopulation wie der Pyramiden-Neuronen von weiterem

entscheidendem Vorteil.
In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kultursystem aus dem embryonalen Ratten-Hippocampus entwickelt, in dem sich die Neuronenpopulation,räumlich getrennt von den Gliazellen, in einem serumfreien, chemisch definierten Kulturmedium entwickelt. Mit diesem System konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung neuronaler Fortsätze von diffusiblen Faktoren abhängt, die von protoplasmatischen Astrozyten produziert werden.

Die Entwicklung der Neuronen in dem neuen, serumfreien Kultursystem wurde mit derjenigen der,in einem reichhaltigen Serummedium kultivierten Zellen verglichen. Das von G.Banker und W.M. Cowan verwendete menschliche Plazentaserum konnte in Ermangelung einer Bezugsquelle nicht verwendet werden, und wurde deshalb durch fötales Kälberserum ersetzt. In dem hier gemachten Vergleich wurden erhebliche Unterschiede zwischen den in serumfreien und den in serumhaltigen Kulturmedien kultivierten Hippocampus-Zellen festgestellt. Diese Unterschiede betrafen sowohl die Zusammensetzung der Kulturen als auch die Morphologie der einzelnen Neuronen:

Unter der serumfreien Bedingung wurde die Entwicklung der neuronalen Zellen begünstigt, etwa 90 % der Zellen in diesen Kulturen sind Neuronen. Im Gegensatz dazu entwickeln sich bei der Kultivierung gleichalter Hippocampi in Gegenwart von Serum überwiegend protoplasmatische Astrozyten (etwa 90 % der gesamten Zellpopulation), nur eine kleine Neuronenpopulation kann auf dem Astrozytenrasen identifiziert werden.
Diese Beobachtung zeigt deutlich die Abhängigkeit der Entwicklung einzelner Zellpopulationen von den gewählten Kulturbedingungen . Im Serum befinden sich eine Vielzahl proliferationsfördernder Faktoren, die Astrozyten und Leptomeninges-Zellen zur Teilung induzieren. Neuronale Zellen in Primärkulturen teilen sich nicht und differenzieren nur, wenn sie ihre Proliferationsphase in <u>situ</u> bereits abgeschlossen haben (G.Banker and W.M.Cowan, 1977). Auf diese Weise wird die Neuronenpopulation rasch von nicht-neuronalen Zellen überwachsen. Die bevorzugt auf dem Astrozytenrasen angehefteten Neuronen dif-

ferenzieren in Gegenwart des Serums und entwickeln die typische Morphologie der Pyramiden-Neuronen in vivo.
Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den von Banker und Cowan gemachten, die unter ihren Kulturbedingungen kaum Astrozyten vorfinden. Die Quelle der Wachstumsfaktoren ist jedoch eine kritische Variable in diesen Kulturen. Es ist denkbar, daß in dem von Banker und Cowan verwendeten Plazentaserum Komponenten sein könnten, die hemmend auf die Proliferation wirken, jedoch die Differenzierung der neuronalen Zellen unterstützen.

In serumfreiem Hormonmedium wird in den hier etablierten Kulturen die Entwicklung der Neuronenpopulation begünstigt. Die Neuronen entwickeln jedoch nicht die voll ausgereifte Morphologie der Pyramiden-Neuronen mit den charakteristischen Dendritenbäumchen. Diese Beobachtung kann darin begründet sein, daß die Pyramiden-Neuronenen zu dem beobachteten Zeitpunkt in Kultur von ihrem genetischen Programm her noch nicht in der Lage sind, Dendritenbäumchen auszubilden, oder daß dem serumfreien Kulturmedium essentielle Komponenten fehlen.
Eine andere Möglichkeit ist die, daß für die Ausbildung der Dendritenbäumchen der direkte Kontakt der Neuriten mit den Astrogliazellen erforderlich ist. Diese Bedingung ist in dem vorliegenden Kultursystem mit den auf Deckgläschen kultivierten Neuronen, die dem Gliarasen aufliegen,nicht erfüllt.Die Beobachtung , daß sich bei einer längeren Überlebensdauer der Neuronen in serumfreiem Kulturmedium (durch häufiges Übertragen der Neuronenkultur in frische serumfreie Gliakulturen bis zu 21 Tagen) die in vivo beobachtete Morphologie ausdifferenzierter Pyramiden-Neuronen nicht entwickelt, spricht für die Beteiligung einer oder beider der letztgenannten Möglichkeiten.

Auch die Morphologie der Astrozytenpopulation in den serumfreien Kulturen unterscheidet sich von den in Gegenwart von Serum kultivierten Gliazellen : In serumfreiem Kulturmedium werden nur die Zellen des fibrillären Astrozytentyps ausgebildet, während sich in Gegenwart von Serum fast ausschließlich große, protoplasmatische Astrozyten entwickeln. Diese

Entwicklung ist vermutlich in dem Mangel an Wachstumsfaktoren in dem serumfreien Kulturmedium begründet.

Die Unterscheidung der einzelnen Neuronenklassen in den serumfreien Kulturen ist schwierig, da die Neuronen nicht die endgültige, in vivo ausgeprägte Morphologie zeigen. Deshalb wurde von einem anderen Mitarbeiter aus diesem Laboratorium (Noel Buckley, 1981) der Anteil der GABAnergen Neuronen mittels der Aufnahme des für Korb-Neuronen spezifischen Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure in diesen Kulturen bestimmt: Er beträgt etwa 30 % der gesamten Neuronenpopulation. Unter Berücksichtigung von etwa 10 % fibrillären Astrozyten (siehe Tabelle 12) sollten sich unter den serumfreien Kulturbedingungen etwa 60 % Pyramiden-Neuronen entwickeln. Diese Beobachtung ist nicht mit den von Banker und Cowan gemachten identisch, die in ihren Kulturen aufgrund morphologischer Kriterien nur Pyramiden-Neuronen zu identifizieren glauben. Die Art und Form der Neuronen in vitro wird jedoch immer durch die gewählten Kulturbedingungen beeinflußt. Besonders bei jungen noch nicht vollständig ausdifferenzierten Neuronen ist die eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Klasse oft schwierig. Auch die biologische Varianz im Alter der embryonalen Versuchstiere könnte zu den unterschiedlichen Beobachtungen in dem System von Banker und Cowan und dem hier entwickelten beigetragen haben.

Die Zusammensetzung der Hippocampus-Kulturen in Gegenwart und in Abwesenheit von Serum zeigt, daß verschiedene Wachstums - und/oder Differenzierungsfaktoren die Entwicklung einzelner Zellpopulationen selektiv fördern.

Durch die Entwicklung des serumfreien Kultursystems aus dem Hippocampus embryonaler Ratten konnte der Einfluß der protoplasmatischen Astrozyten auf das Auswachsen neuronaler Fortsätze gezeigt werden. In diesem System, in dem die Neuronen räumlich getrennt von den Astrozyten auf, dem Gliarasen aufliegenden, Deckgläschen kultiviert werden, werden von den Astrozyten Faktoren in das überstehende Kulturmedium abgegeben, die das Neuritenwachstum bei den auf Deckgläschen kulti-

vierten Neuronen induzieren. Durch die Entwicklung dieser Ko-Kulturen wird erreicht, daß die von den Astrozyten produzierten Faktoren kontinuierlich ins Kulturmedium abgegeben werden und so permanent auf die neuronalen Zellen wirken können. In Abwesenheit der Gliazellen zeigen die konditionierten Medien nur eine kurzfristige Wirkung auf das Neuritenwachstum. Um die in Gegenwart der Gliazellen beobachtete Wirkung zu erzielen, muß das konditionierte Medium häufig erneuert werden.
Faktoren mit Neuriten-induzierender Wirkung werden auch von den Astrozytomalinien B 12 und C 6, jedoch nicht von 3T3-Fibroblasten produziert.
Die molekulare Identität dieser Faktoren ist noch unbekannt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob und wie diese Faktoren bekannten Wachstumsfaktoren - z.B.NGF - gleichen. Dabei ist vor allem die Untersuchung der möglichen Spezifität der von Astrozyten produzierten Faktoren für ZNS-Neuronen von Interesse. Auch ist noch ungeklärt, ob die Astrozyten einen oder mehrere Neuriten-induzierende Faktoren produzieren und ob diese(r) mit den von Astrozytomalinien synthetisierten identisch ist.

Die Mechanismen der Neuriten-induzierenden Wirkung der von Astrozyten produzierten Faktoren können nur als Hypothese diskutiert werden.
Eine Ursache für die Ausbildung von Neuriten ist der direkte Kontakt der Zellen mit einem gegebenen Substrat (P.Letourneau, 1975). Es ist denkbar, daß die von Astrozyten synthetisierten Faktoren an die Poly-L-Lysin-Unterlage oder an Poly-L-Lysin-gebundene Serumkomponenten binden - alle Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen wurden vor dem Ausplattieren der Hippocampus-Neuronen für 12 - 24 Stunden mit serumhaltigem Kulturmedium vorinkubiert - und so durch den direkten Kontakt der Zellen mit dem Substrat das Auswachsen der Fortsätze bedingen.
Eine alternative Hypothese für die Wirkung dieser Faktoren ist ihre Bindung an die Zelloberflächen der Neuronen und ein dadurch in Gang gesetzter Kaskadenmechanismus in der Zelle ,

der auf nuklearer Ebene die Expression der für das Neuritenwachstum verantwortlichen Gene anschaltet und andere Gene supprimiert.

Die Möglichkeit, daß das Auswachsen der Neuriten durch die unmittelbare Wechselwirkung der Neuronen mit den in diesen Populationen enthaltenen fibrillären Astrozyten verursacht wird, ist unwahrscheinlich, da sich Neuronen und fibrilläre Astrozyten in den serumfreien Kulturmedien in Abwesenheit der von den protoplasmatischen Astrozyten produzierten Faktoren nicht entwickeln können. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß die aktiven Faktoren ganz allgemein auf die Ausbildung von Fortsätzen wirken könnten und somit auch die Differenzierung anderer Zellen, wie fibrillärer Astrozyten oder Oligodendrozyten, beeinflussen.

Die von protoplasmatischen Astrozyten produzierten Faktoren scheinen auf die Initiation der Ausbildung der Fortsätze gerichtet zu sein, da die Gegenwart dieser Faktoren allein für die Entwicklung von Dendritenbäumchen nicht ausreicht. Es ist denkbar, daß die Differenzierung der Neuronen in mehrereren Phasen verläuft : Einem von löslichen Astrozyten-Faktoren abhängigen, in dem die prinzipiellen Fasern auswachsen und einem von diesen Faktoren unabhängigen, in dem die charakteristischen Dendritenbäumchen ausgebildet werden. Welche anderen Komponenten die späten Differenzierungsvorgänge beeinflussen, muß die künftige Forschung zeigen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Teil I UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG VON OLIGODENDROZYTEN UND SCHWANN-ZELLEN

Es wurden monoklonale Antikörper (zwei) der Klasse IgG3 produziert, die spezifisch an die Oberflächen der Myelin-bildenden Zellen im ZNS und PNS, die Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, binden.

In zwei verschiedenen Testsystemen wurde die molekulare Spezifität dieser Antikörper bestimmt : Beide monoklonalen Antikörper reagieren mit dem Myelin-spezifischen Sphingolipid Galaktocerebrosid.

Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper und Kaninchen-Antiseren gegen Sulfatid konnte die zeitliche Aufeinanderfolge dieser Sphingolipde in sich entwickelnden Oligodendrozyten und Schwann-Zellen aufgelöst werden: Galaktocerebrosid wird in sich entwickelnden Oligodendrozyten- und Schwann-Zell-Membranen früher als Sulfatid gefunden.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus einem anderen Laboratorium wurde in dieser Arbeit die erste, während der Entwicklung exprimierte Myelin-spezifische Komponente als Galaktocerebrosid identifiziert.

Schwann-Zellen in Kultur verlieren ihre Myelin-spezifischen Galaktosphingolipide in Abwesenheit geeigneter, von Neuronen ausgehender Signale. Dabei verschwindet Sulfatid von den Zelloberflächen - in Umkehrung der Entwicklung - nach kürzerer Kulturdauer als Galaktocerebrosid.

Teil II UNTERSUCHUNGEN ZUR ENTWICKLUNG ZENTRALER NEURONEN

Die Zusammensetzung der Zellpopulation in Kulturen aus dem Hippocampus 18 - 19 Tage alter Rattenembryonen ist von der Wahl der Kulturbedingungen abhängig : In Gegenwart von Serum entwickeln sich überwiegend protoplasmatische Astrozyten (ca.90% der Gesamtpopulation), in serumfreien Kulturen dominieren Neuronen (ca.90% der Gesmtpopulation).

Die Neuronen in serumhaltigem und serumfreiem Kulturmedium unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie : In serumhaltigen Kulturmedien entwickeln sich voll ausgereifte Neuronen mit Dendritenbäumchen, während in serumfreien Medien nur einfache Neuriten beobachtet werden.

Die Ausbildung der Neuriten in den serumfreien Neuronenkulturen ist abhängig von Faktoren, die von primären,protoplasmatischen Astrozyten in das überstehende Kulturmedium abgegeben werden.

Diese Faktoren werden auch von Astrozytomalinien (B 12 und C 6) produziert.

Fibroblasten produzieren keine Neuriten-induzierenden Faktoren.

Das hier entwickelte serumfreie Kultursystem bietet wegen der räumlichen Trennung der Faktoren-produzierenden, protoplasmatischen Astrozyten von den Neuronen und der chemisch definierten Umgebung gute Voraussetzungen für die biochemische Identifizierung der Neuriten-induzierenden Faktoren.

VII. LITERATUR

E.R.Abney, P.P.Bartlett and M.C.Raff

Astrocytes, Ependymal Cells and Oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain

Dev.Biol. 83 (1981) 301-310

B.H.Anderton, R.Thorpe, J.Cohen, Y.Selvendran and P.Woodhams

Specific neuronal localisation by immunofluorescence of 10nm filament polypeptides

J.Neurocyol. 9 (1980) 835-844

G.Banker and W.M.Cowan

Rat Hippocampal neurons in dispersed cell culture

Brain Res. 126 (1977) 397-425

G.Banker and W.M.Cowan

Further observations on hippocampal neurons in dispersed cell culture

J.Comp.Neurol. 187 (1979) 469-494

A.J.Barbera, R.B.Marchase and S.Roth

Adhesive recognition and retino-tectal specificity

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70 (1973) 2482-2486

A.J.Barbera

Adhesive recognition between developing retinal cells and the optic tecta of the chick embryo

Dev.Biol. 46 (1975) 167-191

Y.A.Barde, R.M.Lindsay, D.Monard and H.Thoenen

New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurons

Nature 274 (1978) 818-819

S.H.Barondes

Brain glycomacromolecules and interneuronal recognition

In: Neurosciences Second Study Program , ed.F.O. Schmitt, New York,Rockefeller (1970) 747-760

P.Benda, J.Lightbody and G.Sato

Differentiated rat glial cell strain in tissue culture

Science 161 (1968) 370

M.R.Bennett and V.Nurcombe

The survival and development of cholinergic neurons in skeletal muscle conditioned media

Brain Res. 173 (1979) 543-548

A.Bignami, L.F.Eng, D.Dahl and C.T.Uyeda

Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocates by immunofluorescence

Brain Res. 43 (1972) 429-435

J.Booher and M.Sensenbrenner

Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and brain in flash cultures

J.Neurobiol. 2 (1972) 97-105

M.B.Bornstein

Reconstituted rat tail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximov slides and Roller tubes

Lab.Invest. 7 (1958) 134-137

J.Bottenstein and G.Sato

Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 (1979) 514-517

D.Bray

Surface movements during the growth of single explanted neurons

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 65 (1970) 905-910

D.Bray and D.Gilbert

Cytoskeletal elements in neurons

Ann.Rev.Neurosci. 4 (1981) 505-523

J.Brockes, K.L.Fields and M.C.Raff

A surface antigenic marker for rat Schwann cells

Nature 266 (1977) 364-366

J.Brockes, K.L.Fields and M.C.Raff

Studies on cultured Schwann cells
I.Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve

Brain Res. 165 (1979) 105-118

S.W.Brostoff, Y.D.Karkhanis, D.J.Carlo, W.Reuter and E.H.Eylar

Isolation and partial characterisation of the major proteins of rabbit sciatic nerve myelin

Brain Res. 86 (1975) 449-458

R.P.Bunge

Glial cells and the central myelin sheath

Physiol.Rev. 48,1 (1968) 197-251

J.Cohen, G.Dutton, G.P.Wilkin, J.E.Wilson and R. Balazs

A preparation of viable cell perikaria from developing rat cerebellum with preservation of a high degee of morphological integrity

J.Neurochem. 23 (1974) 899-900

J.Cohen, R.Balazs, F.Hajos, N.Currie and G.Dutton

Separation of cell types from the developing cerebellum

Brain Res. 148 (1978) 313-331

J.Cohen and S.Y.Selvendran

A neuronal cell surface antigen is found in the CNS but not in peripheral neurons

Nature 291 (1981) 421-423

C.W.Cotman and D.A.Matthews

Synaptic plama membranes from rat brain synaptosomes:
Isolation and partial characterisation

Biochim.Biophys.Acta 249 (1971) 380-394

W.M.Cowan

Aspects of neural development

Internat.Rev.of Physiol., Neurophysiol.III R.Porter (ed.), University Park Press, Baltimore
Vol.17 (1978) 149-189

W.M.Cowan

The development of the brain

Sci.Am. 241,3 (1979) 106-117

R.J.Drummond and G.Dean

Comparison of 2'3'cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase and the major component of Wolfgram protein

J.Neurochem. 35 (1980) 1155-1165

H.Eagle

Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture

Science 122 (1955) 501-504

T.Ebendal, M.Belew, C.O.Jacobson and J.Porath

Neurite outgrowth elicted by embryonic chick heart: partial purifacation of the active factor

Neurosci.Letters 14 (1979) 91-95

G.Eisenbarth, F.S.Walsh and M.Nirenberg

Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76 (1979) 4913-4917

E.Engvall and P.Perlmann

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Quantitative Assay of immunoglobulin G

Immunochem 8 (1971) 871-874

E.H.Eylar

The structure and immunologic properties of basic proteins of myelin

Ann.N.Y. Acad.Sci. 195 1972) 481-502

K.Fields, J.Brockes, R.Mirsky and L.Wendon

Cell surface markers for distinguishing different types of dorsal root ganglion cells in culture

Cell 14 (1978) 43-51

J.Folch and P.Stoffyn

Proteolipids from membrane systems

Ann.N.Y.Acad.Sci. 195 (1972) 86-94

H.Fugita and S.Fugita

Electron microscopic studies on the differentiation of the ependymal cells and the glioblasts in the spinal cord of domestic fowl

Z.Zellforsch. 64 (1964) 262-272

J.Fulcrand and A.Privat

Neuroglial reactions secondary to Wallerian degeneration in the optic nerve of the postnatal rat : Ultrastructural and quantitative study

J.Comp.Neurol. 176 (1977) 189-224

H.M.Gerschenfeld, F.Wald, J.A.Zadunaisky and E.D. DeRobertis

Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system

Neurology 9 (1959) 412-425

C.Golgi

Sulla fina anatomica degli organi centrali del sistema nervosa

Pavia (1886)

R.C.Graham and M.J.Karnovsky

The early stages of absorption of injection of horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney:
Ultrastructural cytochemistry by a new technique

J.Histochem.Cytochem. 14 (1966) 291-302

L.A.Greene and E.M.Shooter

The nerve growth factor:
Biochemistry, synthesis and mechanism of action

Ann.Rev.Neurosci. 3 1980) 353-402

S.Greenfield, E.H.Brostoff, E.H.Eylar and P.Morrell

Protein composition of myelin of the peripheral nervous system

J.Neurochem. 20 (1973) 1207-1216

C.A.Henderson, M.Huchet and J.P.Changeux

Neurite outgrowth from chicken spinal neurons is promoted by media conditioned by muscle cells

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78 (1981) 2625-2629

F.A.Henn and A.Hamberger

Glial cell function :
Uptake of transmitter substances

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 68 (1971) 2686-2690

W.His

Die Entwicklung der ersten Nervenbahnen beim menschlichen Embryo : Übersichtliche Darstellung

Arch.Anat.Physiol. , Leipzig, Anat.Abt. 92 (1887) 368-378

W.His

Histogenese und Zusammenhang der Nervenelemente

Arch.Anat.Physiol., Leipzig Anat.Abt. 95 (1890) 95-119

R.W.Holley

Control of growth of mammalian cells in cell culture

Nature, 258 (1975) 487-490

P.Honegger, D.Lenoir and P.Favrod

Growth and differentiation of aggregating fetal brain cells in a serumfree definded medium

Nature 282 (1979) 305-307

R.L.Isaacson and K.H.Pribram (eds.)

'The Hippocampus'

Plenum Press, New York and London (1975) Vol.I and II

M.Jacobson

Developmental Neurobiology

Plenum Press, New York and London (1979), 2nd edition

D.H.Jones and A.I.Matus

Isolation of synaptic plasma membranes from brain by combined flotation-sedimentation density gradient centrifugation

Biochim.Biophys.Acta 356 (1974) 276-287

J.F.Kearney, A.Radbruch. B.Liesegang and K.Rajewsky

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines

J.Immunol. 123 (1979) 1548-1550

M.W.Kies, R.E.Martenson and G.E.Deibler

Myelin basic protein

In: 'Functional and structural proteins of the nervous system' , N.A.Davison, P.Mandel and G.Morgan (eds.) Plenum Press, New York (1972)

G.Köhler and C.Milstein

Continous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

Nature 256 (1975) 495

S.Kuffler and J.G.Nicholls

The physiology of neuroglial cells

Ergeb.Physiol. 57 (1966) 1-90

R.W.Ledeen, F.B.Cochran, R.K.Yu, F.G.Samuels and J.E.Haley

Gangliosides of the CNS myelin membrane

Adv.Exp.Med.Biol. 125 (1980) 167-176

P.Letourneau

Cell to substratum adhesion and guidance of axonal elongation

Dev.Biol. 44 (1975) 92-101

R.Levi-Montalcini and V.Hamburger

A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotisation of viscera in the chick embryo

J.Exp.Zool. 123 (1953) 233-288

R.Levi-Montalcini

The nerve growth factor : Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells

Harvey Lectures 60 (1966) 217-259

R.Lindsay

Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-insensitive neurons

Nature 282 (1979) 80-82

J.W.Littlefield

Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants

Science 145 (1964) 709

O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr and R.J.Randell

Protein measurement with the Folin-Phenol reagent

J.BiolChem. 193 (1953) 265-275

E.Mena, C.Hoeser and B.Moore

An improved method of preparing rat brain synaptic membranes :
Elimination of a contaminating membrane containing 2'3'cyclic nucleotide 3'phosphohydrolase activity

Brain Res. 188 (1980) 207-231

R.Mirsky, L.Wendon, P.Black, C.Stolkin and D.Bray

Tetanus Toxin : a cell surface marker for neurons in culture

Brain Res. 148 (1978) 251-259

R.Mirsky, J.Winter, E.R.Abney, R.M-Pruss, J.Gavrilovic and M.C.Raff

Myelin-specific proteins and glycolipids in rat Schwann cells and oligodendrocytes in culture

J.Cell Biol. 84 (1980) 483-494

G.E.Moore, R.E.Gerner and H.A.Franklin

Culture of normal human leucocytes

J.Am.Med.Assoc. 199 (1967) 519-524

B.Niedick

On a glycolipid hapten of myelin

Prog.Allergy 18 (1975) 353-422

W.T.Norton and L.A.Autilio

The lipid composition of purified bovine brain myelin

J.Neurochem. 13 (1966) 213-222

W.T.Norton

Isolation and characterisation of myelin

In: 'Myelin' , P.Morrell, ed., Plemum Press, New York (1977) 161-199

J.H.Peacock, D.F.Rush and L.H.Mathews

Morphology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice

Brain Res. 169 (1979) 231-246

J.Peacock

Electrophysiology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice

Brain Res. 169 (1979) 247-260

M.C.Raff, R.Mirsky, K.L.Fields, R.P.Lisak, S.D.Dorfmann, D.Silberberg, N.A.Gregson, S.Liebowitz, M.C. Kennedy

Galactocerebroside is a specific cell surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture

Nature 274 (1978) 813-816

M.C.Raff, K.L.Fields, S.Hakomori, R.Mirsky, R.Pruss and J.Winter

Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture

Brain Res. 174 (1979) 283-308

M.C.Raff

Persönliche Mitteilung (1981)

S.Ramon Y Cajal

Histologie du systeme nerveaux de l'Homme et des vertebrés

Reprinted by Instituto Ramon Y Cajal del C.S.I.C., Madrid 1952-1955
1909-1911, L.Azonlay (trans.)

F.Rappaport, J.Fischl and N.Pinto

An improved method for the estimation of cholin-esterase activity in serum

Clin.Chim.Acta 4 (1959) 227

L.Sarliève

Persönliche Mitteilung (1981)

F.C.Sauer

Mitosis in the neural tube

J.Comp.Neurol. 62 (1935) 377-405

M.Schachner

Persönliche Mitteilung (1981)

D.Schubert, S.Heinemann, W.Carlisle, H.Tasikas, B. Kimes, J.Patrick, J.H.Steinbach, W.Culp and B.Brandt

Clonal cell lines from the rat central nervous system

Nature 249 (1974) 224-227

G.M.Shepherd

The synaptic organisation of the brain

Oxford, University Press (1979)

C.S.Sherrington

The integrative action of the nervous system

New Haven, Yale University Press (1906)

D.Simkovic

Contribution to the method of cultivation of cells on transparent collagen gel

Exp.Cell Res. 17 (1959) 573-576

R.Sperry

Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 50 (1963) 703-710

R.Sperry

In:'Organogenesis' R.L.DeHaan, H.Ursprung (eds.) New York, Holt Rinehart,Winston (1965) 170

T.J.Sprinkle,M.R.Wells, F.A.Garver and D.B.Smith

Studies on the Wolfgram high molecular weight CNS myelin proteins : Relationship to 2'3'cyclic nucleotide phosphodiesterase

J.Neurochem. 35 (1980) 1200-1208

N.H.Sternberger, J.Itoyama, M.W.Kies and H.de F. Webster

Immunochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat CNS

J.Neurocyt. 7 (1978) 251-263

E.Svennerholm and L.Svennerholm

The separation of neutral blood-serum glycolipids by thinlayer-chromatography

Biochim.Biophys.Acta 70 (1963) 432-441

G.Tennekoon, S.Cohen, D.Price and G.McKhann

Myelinogenesis in optic nerve:
A morphological, autoradiographic and biochemical analysis

J.Cell Biol. 72 (1977) 604-616

G.I.Tennekoon, j.Kishimoto, I.Singh, G.Nonaka and J.M.Bourre

The differentiation of oligodendrocytes in the rat optic nerve

Dev.Biol. 79 149-158

G.J.Todaro and H.Green

Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines

J.Cell Biol. 17 (1963) 299-313

S.Varon, M.Manthorpe and R.Adler

Cholinergic neurotrophic factors:
I.Survival, neurite outgrowth and choline acetyltransferase activity in monolayer cultures from chick embryo ciliary ganglia

Brain Res. 173 (1979) 29-45

R.Virchow

Cellular Pathology, Churchill, London (1860) 277

M.Vogt and R.Dulbecco

Steps in the neoplastic transformation of hamster embryo cells by polyoma virus

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 49 (1963) 171-179

T.Vulliamy, S.Rattray and R.Mirsky

Cell-surface antigen distinguishes sensory and autonomic peripheral neurons from central neurons

Nature 291 (1981) 418-420

H.deF.Webster

Development of peripheral myelinated and unmyelinated nerve fibers

In: 'Peripheral Neuropathy' P.J.Dyck, P.K.Thomas and E.H.Lambert (eds.) Saunders, Philadelphia (1975)

F.Wolfgram

A new proteolipid fraction of the nervous system

J.Neurochem. 13 (1966) 461-470

P.Wood, E.Okada and R.Bunge

The use of networks of dissociated dorsal root ganglion neurons to induce myelination by oligodendrocytes in culture

Brain Res. 196 (1980) 247-252

E.Yavin and Z.Yavin

Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemisheres on polylysine coated surface

J.Cell Biol. 62 (1974) 540-546

S.H.Yen and K.Fields

Antibodies to neurofilament, glial filament and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types in the nervous system

J.Cell Biol. 88 (1981) 115-121

Lebenslauf

Name	Bärbel Ranscht
Geburtsdatum	1.1.1952
Geburtsort	Merseburg
Eltern	Achim Ranscht, Betriebswirt Erika Ranscht geb.Gürtzsch, Prokuristin
Schulbildung	1958 - 1962 Matzenberg-Grundschule in Pirmasens 1962 - 1970 Staatliches Neusprachliches Gymnasium Pirmasens Juni 1970 Reifeprüfung
Hochschulbildung	1970 - 1971 Studium der Biologie und der Mathematik an der Universität Heidelberg 1971 - 1977 Studium der Biologie an der Universität Tübingen 1977 - 1979 Diplomarbeit am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Institute, Tübingen Thema 'Untersuchungen zum Wachstum und zur Differenzierung von Nervenzellen in Kultur' unter Anleitung von Dr.habil.W.Seifert März 1979 Diplom März 1979 - November 1981 Arbeit an der vorliegenden Dissertation bei Dr.habil.W.Seifert am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Institute in Tübingen und während eines dreimonatigen Forschungsaufenthalts bei Prof.M.Raff am University College, London.

Akademische Lehrer

D.Ammermann, V.Braitenberg, H.J.Dahmen, F.W.Bentrup, W.Harder, K.Kirschfeld, D.Mecke, H.Metzner, N.Ninnemann, E.Pfaff, H.Probst, M.Raff, W.Rüdorff, H.Schenck, B.Schwemmle, W.Seifert, M.Siess, D.Varju, M.Wabl, H. Zähner